UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD LYON I
U.E.R. MEDECINE LYON-NORD

ANNEE 1979 - N° 428

«ETUDE D'UN ANTIGENE VACCINANT CONTENU DANS LE SURNAGEANT DE CULTURE DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* SOUCHE M-206»

Travail de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
(Chef de Laboratoire : Médecin Chef des Services R. FONTANGES)

THESE

présentée à
l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON
et soutenue publiquement le 30 octobre 1979
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN MEDECINE

par

DELORD Guillaume Marie Jean
né le 21 Avril 1949
à NEUILLY-SUR-SEINE (Hauts-de-Seine)

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé des Armées de LYON.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554215_0027

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD LYON I
U.E.R. MEDECINE LYON-NORD

ANNEE 1979 - N° 428

«ETUDE D'UN ANTIGENE VACCINANT CONTENU DANS LE SURNAGEANT DE CULTURE DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* SOUCHE M-206»

Travail de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
(Chef de Laboratoire : Médecin Chef des Services R. FONTANGES)

THESE

présentée à
l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON
et soutenue publiquement le 30 octobre 1979
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN MEDECINE

par

DELORD Guillaume Marie Jean
né le 21 Avril 1949
à NEUILLY-SUR-SEINE (Hauts-de-Seine)

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé des Armées de LYON.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD — LYON I

Président honoraire : M. le Pr J. BOIDIN

Président : M. le Pr D. GERMAIN
Premier Vice-Président : M. le Pr E. ELBAZ
Deuxième Vice-Président : M. ROUSSET, Attaché de Recherche
Troisième Vice-Président : M. BRULA, Etudiant
Secrétaire Général de l'Université : M. J. RAMBAUD, Administrateur civil.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (U.E.R.)

U.E.R. de Médecine GRANGE-BLANCHE	: M. le Pr Bernard SALLE
U.E.R. de Médecine ALEXIS-CARREL	: M. le Pr René MORNEX
U.E.R. de Médecine LYON-NORD	: M. J.P. NEIDHART, M.C.A.
U.E.R. de Médecine SUD-OUEST	: M. le Pr Jean NORMAND
U.E.R. de Sciences Pharmaceutiques	: M. le Pr C.A. BIZOLLON
U.E.R. de Techniques et de réadaptation	: M. Alain MORGON, M.C.A.
U.E.R. de Biologie humaine	: M. le Pr Jean-Pierre REVILLARD
U.E.R. I.R.E.P.S.	: M. Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.
U.E.R. de Sciences Odontologiques	: M. le Dr Roger VINCENT
U.E.R. de Mathématiques	: M. le Pr Philippe PICARD
U.E.R. de Physique	: M. le Pr Jean DELMAU
U.E.R. de Chimie et Biochimie	: M. le Pr Jean HUET
U.E.R. des Sciences de la Nature	: M. le Pr René GINET
U.E.R. de Sciences Physiologiques	: Mlle le Pr J.F. WORBE
U.E.R. de Physique Nucléaire	: M. le Pr Mark GUSAKOW
I.U.T. I	: M. le Pr Albert VILLE
I.U.T. II	: M. J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.
Observatoire de Lyon	: M. Guy MONNET, Astronome Adjoint
U.E.R. de Mécanique	: Mlle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD LYON I — U.E.R. MEDECINE LYON-NORD

THESE DE Monsieur Guillaume DELORD

COMPOSITION DU JURY

PRESIDENT :	Professeur A. BERTOYE	(U.E.R. LYON-NORD)
ASSESSEURS :	Professeur J. BERTRAND	(U.E.R. LYON-NORD)
	Professeur P. VINCENT	(U.E.R. LYON-NORD)
	Professeur R. FONTANGES	(C.R.S.S.A.)
	Docteur O. CREACH	(C.R.S.S.A.)

A mon père et à ma mère
A mon épouse, à notre fils
A mon frère et à ma sœur
A notre famille et à notre belle-famille

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur A. BERTOYE
Professeur titulaire de la Chaire de Clinique des Maladies Infectieuses à l'Université Claude-Bernard - LYON I.

A la Faculté comme à l'hôpital, nous avons pu apprécier sa grande compétence et ses qualités humaines. Par la suite, il nous a toujours accueilli dans son service avec une extrême bienveillance, n'hésitant pas à sacrifier son temps pour nous guider de ses conseils éclairés.

Nous sommes très sensible à l'honneur qu'il nous fait d'accepter la présidence de cette thèse et nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur J. BERTRAND
Professeur titulaire de la Chaire de Biochimie à l'Université Claude-Bernard - LYON I

Nous lui sommes particulièrement reconnaissant d'avoir bien voulu nous accueillir dans son laboratoire au cours de nos études et d'avoir, par son enseignement et ses conseils, développé en nous le goût de la recherche.

En s'intéressant à notre travail et en acceptant de le juger, il nous a donné une nouvelle preuve de sa bienveillance.

Nous voudrions lui présenter ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur P. VINCENT
Maître de Conférences Agrégé à l'Université Claude-Bernard - LYON I
Biologiste des hôpitaux.

Nous lui sommes reconnaissant de l'intérêt qu'il a su porter à notre travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Médecin Chef des Services R. FONTANGES
Maître de Recherches du Service de Santé des Armées
Maître de Conférences à l'Université Claude-Bernard - LYON I
Chef de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées de Lyon.

Il a bien voulu nous confier ce thème de recherche et nous permettre de le mener rapidement à terme en nous accordant le soutien efficace de son laboratoire.

Nous sommes particulièrement heureux de le compter aujourd'hui parmi nos juges, et nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Pharmacien Chimiste en Chef O. CREACH
Maître de Recherches du Service de Santé des Armées.

Pendant deux années, il n'a ménagé ni sa peine, ni son temps. Nous avons pu apprécier son dévouement, sa rigueur scientifique et son expérience dont il a toujours su nous faire profiter.

Nous aimerions qu'il trouve ici l'expression très sincère du respect et de la profonde reconnaissance que nous lui témoignons.

Nous tenons à remercier le personnel civil et militaire de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées pour son aide précieuse, et en particulier·

Monsieur le Pharmacien Chimiste Principal B. IVANOFF
Assistant de Recherches du Service de Santé des Armées.

Monsieur le Pharmacien Chimiste Principal P. BIENVENU

et aussi

Mademoiselle Florence CONDEMINE, Messieurs Gérald CAILLOT, Pierre CHAVENT, Christian DELHOMME, Jean-Pierre MAISON et Michel POULET.

A Monsieur le Médecin Général Inspecteur RONFLET
Directeur Central du Service de Santé des Armées.

A Monsieur le Médecin Général Inspecteur L. GIRIER
Directeur du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

A Monsieur l'Ingénieur Général de l'Armement
Directeur des Recherches et Etudes Techniques.

A Monsieur le Médecin Général Inspecteur J. THALABARD
Commandant l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon.

A Monsieur le Médecin Chef des Services J. SEPETJIAN
Commandant en second l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon.

Aux cadres et aux personnels de l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon.

A Monsieur le Médecin en Chef H.M. ANTOINE
Professeur agrégé du Val de Grâce
Médecin Chef de la Biologie Médicale.

A Monsieur le Médecin en Chef R. NICOLLE
Professeur agrégé du Val de Grâce.

Pendant notre stage interné, ils nous ont fait découvrir les problèmes pratiques posés par la prévention des fièvres typho-paratyphoïdiques et le traitement des salmonelloses.

En témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1ère partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : ACTUALITE DES INFECTIONS A SALMONELLES

1. Données épidémiologiques récentes 3
   1.1. Fièvres typho-paratyphoïdiques 3
   1.2. Salmonelloses «non typhoïdiques» 5
      1.2.1. **Salmonella typhimurium**
      1.2.2. **Salmonella wien**
      1.2.3. **Salmonella panama**
      1.2.4. Autres sérotypes
2. Résistance des salmonelles aux antibiotiques 9
   2.1. **S. typhi** et **S. paratyphi** 9
      2.1.1. **S. typhi**
      2.1.2. **S. paratyphi**
   2.2. Autres salmonelles 10
      2.2.1. **S. typhimurium**
      2.2.2. **S. wien** et **S. panama**
   2.3. Origine de la résistance aux antibiotiques 12
      2.3.1. Les plasmides de résistance
      2.3.2. Plasmides de **S. typhi** et **S. paratyphi**
      2.3.3. Plasmides des autres salmonelles
   2.4. Conclusions thérapeutiques concernant l'antibiothérapie 13
      2.4.1. Fièvres typho-paratyphoïdiques
      2.4.2. Salmonelloses «non typhoïdiques»
3. Transmission et portage des salmonelles 14
   3.1. Transmission des fièvres typho-paratyphoïdiques 14
      3.1.1. Importance de l'eau
      3.1.2. Importance du portage
   3.2. Transmission des salmonelloses «non typhoïdiques» 14
      3.2.1. Contamination d'origine animale
      3.2.2. Contamination inter-humaine, «manu portée»
      3.2.3. Rapport entre les deux modes de contamination
   3.3. Portage des salmonelles 16
      3.3.1. Les porteurs transitoires
         3.3.1.1. Les convalescents de gastro-entérite
         3.3.1.2. Les porteurs sains découverts par examen systématique
      3.3.2. Les porteurs chroniques
      3.3.3. Influence de l'antibiothérapie sur le portage
      3.3.4. Essai d'éradication du portage
4. Aspects cliniques des salmonelloses «non typhoïdiques» 17
   4.1. Principales formes cliniques 18
      4.1.1. Les gastro-entérites
      4.1.2. Les manifestations extra-digestives
         4.1.2.1. Les formes septicémiques
         4.1.2.2. Les autres formes
   4.2. Importance du sérotype 18
   4.3. Importance du terrain 19
      4.3.1. L'âge
      4.3.2. Les états morbides pré-existants
         4.3.2.1. Les néoplasies
         4.3.2.2. Les traitements immuno-dépresseurs
         4.3.2.3. Les autres états
5. Conclusion 20

CHAPITRE 2 : POSSIBILITES D'AMELIORATION DE LA PREVENTION VACINALE

1. Choix du critère d'efficacité 21
1.1. Insuffisance de la notion classique d'antigénécité 21
1.2. Essais contrôlés sur le terrain 21
1.3. Epreuve sur volontaires 22
1.4. Utilisation d'un modèle animal 22

2. Valeur des vaccins inactivés injectables 23
2.1. Efficacité relative du vaccin TAB 23
2.2. Résultats observés sur les animaux 24
2.3. Obstacles à l'utilisation des vaccins inactivés 24
3. Supériorité des vaccins buccaux 24
3.1. Vaccins inactivés 24
3.1.1. Chez l'homme
3.1.2. Chez l'animal
3.2. Vaccins vivants 25
3.2.1. Chez l'homme
3.2.2. Chez l'animal
3.3. Autres avantages des vaccins buccaux 26

4. Intérêt des constituants bactériens purifiés 26
4.1. Inefficacité des antigènes connus 27
4.1.1. Antigène O
4.1.2. Antigène Vi
4.1.3. Antigène H
4.1.4. L'antigène commun des entérobactéries (ECA)
4.2. Vers la découverte de l'«antigène protecteur» 28
4.2.1. Efficacité des vaccins ribosomaux
4.2.2. Nature du facteur immunisant
4.2.3. La voie de l'antigène soluble
4.2.3.1. Extraction à partir des bactéries
4.2.3.2. Extraction à partir des surnageants de culture

5. Conclusion 30

2ème partie : TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES

1. Préparation de l'antigène brut 32
1.1. La souche avirulente 32
1.2. Culture des bactéries 32
1.3. Extraction des antigènes 32

2. Purification de l'antigène 34
2.1. Chromatographie d'exclusion 34
2.1.1. Principe
2.1.2. Gels utilisés
2.1.2.1. Gels de dextranes
2.1.2.2. Gels mixtes
2.1.3. Détermination du P.M. et notion de Kav
2.1.4. Protocole expérimental
2.1.4.1. Préparation du gel
2.1.4.2. Remplissage des colonnes
2.1.4.3. Dépôt des échantillons
2.1.4.4. Elution
2.2. Chromatographie par échange d'ions 37
2.2.1. Principe
2.2.2. Principaux échangeurs d'ions
2.2.3. Protocole expérimental
2.2.3.1. Choix de l'échangeur
2.2.3.2. Préparation de la colonne
2.2.3.3. Chargement et élution
2.3. Chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite 38
2.3.1. Principe
2.3.2. Protocole expérimental
2.3.2.1. Choix du gel
2.3.2.2. Préparation de la colonne
2.3.2.3. Chargement et élution

2.4. Isoélectrofocalisation 39
2.4.1. Sur gradient de saccharose (colonne)
2.4.1.1. Principe
2.4.1.2. Matériel
2.4.1.3. Solutions utilisées
2.4.1.4. Protocole expérimental
2.4.2. Sur gel granuleux (plaque)
2.4.2.1. Principe
2.4.2.2. Matériel
2.4.2.3. Réactifs utilisés
2.4.2.4. Protocole expérimental

3. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS 44
3.1. Principe 44
3.2. Matériel 44
3.3. Solutions utilisées 44
3.3.1. Tampon électrophorétique
3.3.2. Tampon pour échantilons
3.3.3. Solution solubilisante
3.3.4. Solution de fixation, éliminant le SDS
3.3.5. Solution de coloration
3.3.6. Solution de décoloration
3.4. Protocole expérimental 45

4. Analyse spectrographique 45
4.1. La spectrographie U.V. 45
4.2. La spectrographie I.R. 45

5. Analyse chimique 46
5.1. Dosage des protéines 46
5.2. Dosage des acides aminés 46
5.3. Dosage des glucides 47
5.4. Dosage du phosphore 47

6. Mesure du pouvoir vaccinant 47
6.1. Les animaux 47
6.2. La souche pathogène 47
6.3. Vaccins vivants témoins 48
6.4. Protocole de vaccination 48
6.5. Epreuve 48
6.6. Expression des résultats 48

CHAPITRE 2 : RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Etude des principales caractéristiques de la fraction ⑤ 49
1.1. Rendement des préparations 49
1.2. Pouvoir immunisant 49
1.3. Analyse chimique 50
1.4. Analyse spectrographique 50

2. Fractionnement chromatographique 51
2.1. Chromatographie d'exclusion 51
2.1.1. Ultrogel AcA 34
2.1.2. Ultrogel AcA 54
2.1.3. Ultrogel AcA 202
2.2. Chromatographie par échange d'ions 54
2.3. Chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite 55

3. Fractionnement par isoélectrofocalisation 56
3.1. Isoélectrofocalisation sur gradient de saccharose 56
3.1.1. Avec gradient de pH variant de 3 à 10 (Pharmalyte*)
3.1.2. Avec gradient de pH variant de 3,5 à 10 (Ampholine*)
3.1.3. Bilan pondéral
3.2. Isoélectrofocalisation sur gel granuleux 58

4. Etude du pouvoir protecteur des fractions séparées 59

5. Détermination du poids moléculaire des différentes fractions 60
5.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 60
5.2. La chromatographie d'exclusion 61

DISCUSSION GENERALE

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La somme des travaux consacrés jusqu'à présent à la vaccination contre les infections à salmonelles est impressionnante, comme en témoigne l'analyse exhaustive effectuée par J. BRUNOT, voici deux ans (43). En dépit de ces recherches, on ignore encore aujourd'hui aussi bien la localisation cellulaire et la structure chimique de l'antigène vaccinant que le mécanisme de l'immunité intestinale vis-à-vis de la bactérie d'épreuve. L'intérêt de ces études peut d'ailleurs paraître mince, dans la mesure où il existe déjà, pour la prévention des fièvres typho-paratyphoïdiques, un vaccin TAB dont l'efficacité à l'échelon collectif est démontrée. Au surplus, les cas de fièvres typho-paratyphoïdiques, devenus rares en France du fait de l'amélioration des conditions d'hygiène, demeurent pour l'instant facilement contrôlables par les moyens thérapeutiques, à tel point que le maintien de l'obligation vaccinale dans certaines collectivités a été un moment contesté.

Pourtant, dans un rapport présenté en 1977 devant le Comité Consultatif de Santé des Armées, H.M. ANTOINE et R. NICOLLE (6) jugent insuffisants les arguments retenus à l'encontre de la vaccination TAB et concluent à la nécessité de sa poursuite chez les militaires. Plus récemment, P. MONNET (187), tout en approuvant la décision du Service de Santé des Armées, rappelle que la législation en vigueur impose également la vaccination des civils exposés de par leur profession ou du fait de circonstances particulières, et déplore qu'il n'existe en France aucun vaccin limité au composant T, dont il conseillerait l'injection aux personnes amenées à se rendre dans les zones d'infestation.

Le plus important, à nos yeux, est que ces auteurs, suivis d'ailleurs par un certain nombre d'autres épidémiologistes (20, 21) aient cru bon de souligner la nécessité de revoir la technique vaccinale en fonction des résultats obtenus dans divers laboratoires au cours de la dernière décennie, résultats qui font apparaître la supériorité de la voie buccale sur la voie parentérale pour la protection des animaux contre une dose d'épreuve de salmonelles pathogènes, mais qui démontrent aussi la faible efficacité des vaccins inactivés par rapport à celle des vaccins vivants ou des antigènes purifiés. Notons au passage que ces souhaits s'accordent pleinement avec les recommandations exprimées par les experts de l'O.M.S., dès 1972, concernant la prévention des infections intestinales (191).

L'utilité des recherches consacrées à l'antigène protecteur des salmonelles tient également au fait que le développement des voyages d'affaires, l'extension du tourisme, l'utilisation de plus en plus fréquente d'aliments préconditionnés, l'augmentation des échanges alimentaires entre pays ont considérablement modifié le problème des infections à salmonelles, autant humaines qu'animales au cours de ces dernières années. D'autre part, l'emploi des antibiotiques sur une grande échelle a entraîné l'apparition d'un nombre de plus en plus grand de souches multi-résistantes. Certes, la thérapeutique conserve tout son intérêt, mais la prévention doit constituer le souci principal de l'hygiéniste. Il s'agit, au demeurant, de la solution la moins onéreuse pour la collectivité. Ajoutons enfin que les découvertes intéressant les salmonelles devraient logiquement s'appliquer aux bactéries entéropathogènes voisines.

L'étude que nous avons entreprise s'inscrit dans l'ensemble des travaux effectués à la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, en vue de la purification et de la caractérisation des antigènes protecteurs contenus dans les surnageants de culture des entérobactéries. Les résultats obtenus antérieurement avaient montré que, dans le cas de **Salmonella typhimurium,** le pouvoir vaccinant appartenait à plusieurs constituants de tailles différentes (129, 244, 246, 249). J. BRUNOT (43) s'était particulièrement intéressé aux fractions de poids moléculaire supérieur à 3×10^5, qu'il avait isolées par des méthodes chromatographiques. Nous avons porté notre attention sur les molécules de plus petite taille, que nous avons purifiées par des techniques différentes.

Nous avons pensé qu'il était utile de faire précéder l'exposé de nos résultats personnels et la discussion de ces derniers d'un résumé des données bibliographiques concernant l'importance actuelle des infections à salmonelles et les acquisitions récentes relatives à leur prévention vaccinale.

1ère PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

ACTUALITÉ DES INFECTIONS A SALMONELLES

1. Données épidémiologiques récentes.

1.1. Fièvres typho-paratyphoïdiques.

La dernière épidémie importante est apparue au Mexique, en Inde et au Viet-Nam en 1972. Elle était due à diverses souches de **S. typhi,** et sa gravité fut telle qu'on enregistra 10000 cas de fièvres typhoïdes pour le seul Mexique (45, 108). Quelques cas sporadiques dérivant de cette épidémie dramatique et extraordinairement extensive ont été recensés l'année suivante en Angleterre et en Suisse par WALDVOGEL et PITTON (263), puis en France par CHABBERT (51).

Malgré tout, la menace d'une nouvelle épidémie reste permanente, et partout dans le monde, comme en témoigne le tableau 1, emprunté à H.M. ANTOINE et R. NICOLLE (6), on continue à enregistrer des cas de fièvres typhoïdes. En France, celles-ci sont dues essentiellement à **S. typhi** et **S. paratyphi B** (203), **S. typhi** l'emportant sur **S. paratyphi** avec 36 cas sur 46, d'après AUBERTIN (in 6).

On peut estimer que, dans notre pays, l'état endémique reste contrôlé avec 1040 cas de fièvres typhoïdes déclarés en 1972, 1045 cas en 1974 et 1110 cas en 1975. Mais il n'en a pas toujours été ainsi, comme en témoigne le tableau 2 rapporté par MONNET (187). D'après cet auteur, la régression de l'endémie typhique en France est à mettre davantage au compte de l'amélioration des conditions d'hygiène qu'à celui de la vaccination.

La situation n'est pas aussi favorable partout : ainsi, en Algérie, au C.H.U. d'El KETTAR, AIT KHALED et coll. (2) ont recensé 1664 cas de fièvres typhoïdes, essentiellement chez les adultes, et le décompte par année fait apparaître une certaine recrudescence dans cette région :

année	1971	1972	1973	1974	1975	1976
nombre de cas	221	153	368	316	326	280

La fréquence de **S. typhi** et **S. paratyphi** par rapport à celle des autres sérotypes responsables des salmonelioses «non typhoïdiques» est le plus souvent négligeable. Cependant, il ressort de la littérature qu'il existe des zones d'endémie où **S. typhi** et **S. paratyphi** prédominent. C'est le cas pour le Cameroun, où ETOUNDI ESSOMBA MANY (97) a isolé, de 1960 à 1975, 1103 souches de **Salmonella** dont 703, soit 64 p. 100, correspondent à **S. typhi.** Celles-ci, heureusement, restent sensibles au chloramphénicol.

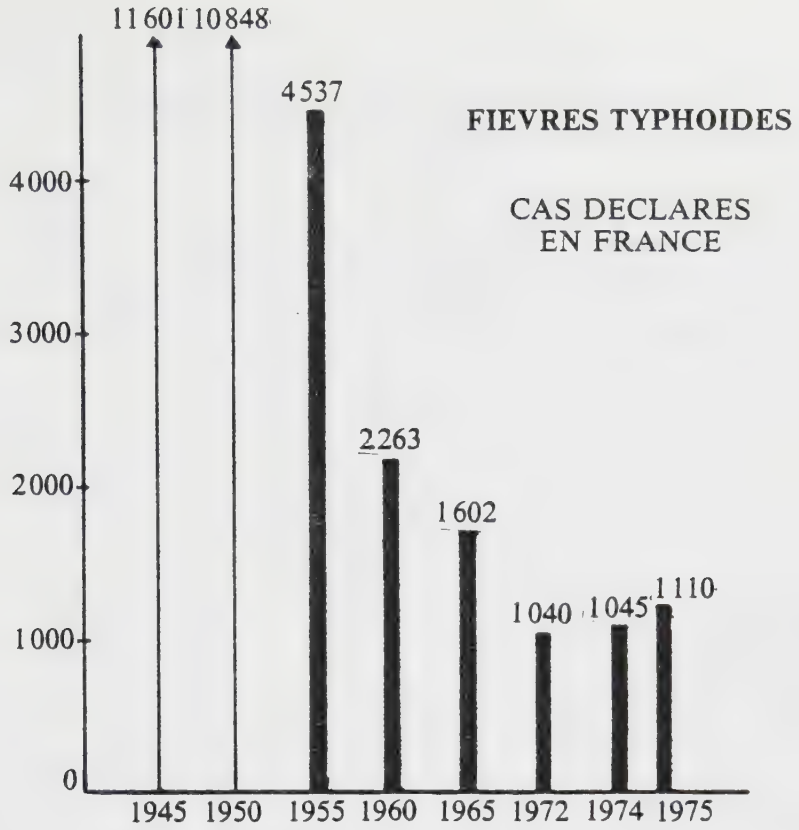
L'endémie persiste donc actuellement avec un nombre de cas recensés qui mérite l'attention, d'autant plus que la morbidité est loin d'être négligeable, et que chaque cas, ainsi que nous le verrons, peut poser un problème soit thérapeutique, soit prophylactique.

FIEVRES TYPHOIDES
Indices de Morbidité dans le Monde - Année 1975

Tableau 1

	Population x 1000	Nombre de cas	Morbidité (1000 h)
GUATEMALA	5189	1484	0,29
RHODESIE DU SUD	5270	1541	0,29
MAROC	15379	3724	0,24
ALGERIE	14330	2125	0,15
TUNISIE	5137	702	0,14
ITALIE	53667	7125	0,13
BOLIVIE	4931	631	0,13
U.S.A.	203235	22987	0,11
ZAIRE	21568	1617	0,07
SOUDAN	15691	1063	0,07
PORTUGAL	9630	627	0,06
GRECE	8892	512	0,05
NIGERIA	15074	660	0,04
TURQUIE	35666	1280	0,03
BRESIL	93205	3148	0,03
FRANCE	50777	1110	0,02
R.F.A.	61508	1045	0,01
CANADA	21406	179	0,008
NORVEGE	3879	29	0,007
LUXEMBOURG	339	2	0,006
ROYAUME UNI	55348	281	0,005
PAYS-BAS	13019	56	0,004
DANEMARK	4921	15	0,003
BELGIQUE	9676	24	0,002

Tableau 2



1.2. Salmonelloses «non typhoïdiques».

Quelque 1 700 stérotypes du genre **Salmonella,** autre que **S. typhi** et **S. paratyphi A** et **B,** sont responsables des salmonelloses digestives, «non typhoïdiques», ou dites mineures, représentant ainsi une entité toute différente de celle des fièvres typho-paratyphoïdiques.

Beaucoup de porteurs échappent au recensement (158) ; d'autre part, celui-ci est forcément incomplet du fait que la déclaration obligatoire n° 12 ne concerne que les toxi-infections alimenmentaires collectives. Les salmonelloses «non typhoïdiques» peuvent donc paraître en relative stagnation, leur prédominance étant difficile à apprécier. En réalité, les études épidémiologiques récentes de FOX en 1974 (105) et de LE MINOR en 1975 (160) montrent une progression régulière et constante de ces salmonelloses. Selon les chiffres fournis par le Center of Diseases Control (C.D.C.) d'Atlanta, rapportés par HOOK (124), 31,4 p. 100 des toxi-infections alimentaires recensées aux U.S.A. depuis une vingtaine d'années sont dues à des salmonelles autres que **S. typhi** et **S. paratyphi.**

Dans un article publié en 1979, CHARMOT et BRUMPT (56) soulignent également que, si les fièvres typhoïdes autochtones sont en régression, les salmonelloses digestives, en revanche, sont en nette augmentation, leur incidence étant plus forte dans les pays tropicaux puisque le nombre des porteurs y est de 4 p. 100 alors qu'il n'est que de 0,5 à 1 p. 100 en France.

Par ailleurs, en milieu hospitalier, les salmonelloses «non typhoïdiques» sont nettement plus fréquentes que les cas de fièvres typho-paratyphoïdiques, notamment ces dernières années, comme en témoignent BERTOYE et GOUT (115, 197) avec 89 et 83 p. 100 de salmonelloses digestives, encore que ces valeurs paraissent nettement supérieures à celles trouvées par BAJOLLE, BARDIE, CAZAURAN, MERLET et ESTAVOYER (17, 19, 50, 96, 180).

En fait, si chaque sérotype peut être responsable de cas sporadiques ou d'épidémies, certains d'entre eux sont retrouvés avec une fréquence particulière, et l'on peut dire avec CHARMOT et BRUMPT (56) qu'une dizaine de sérotypes seulement représente 70 p. 100 des infections humaines.

Fréquence des sérotypes selon les régions
d'après GOUT (115)

Tableau 3

région	C.N.S.	Grenoble	Besançon	Bordeaux	Reims	Tours
année	70/72	74/77	70/74	64/75	70	65/71
nombre de cas	—	248	261	330	—	86
S. typhimurium	21,9	40	8	24	—	36
S. wien	12,7	23	12	7	—	—
S. ibadan	0,2	8	—	—	—	1,2
S. panama	8,1	6	70	30	épidémie	7
S. brandenburg	4,2	3	—	5	épidémie	7
S. isangi	0,04	3	—	—	—	—
S. senftenberg	1,1	2	2	—	—	—
S. java	1,3	1	—	—	—	épidémie 26
S. enteritidis	4,1	1	4	—	—	9
S. newport	1,5	1	1	—	—	1,2
S. havane	0,5	1	—	—	—	—
S. heidelberg	1,3	1	1	—	—	1,2
S. saint paul	2,9	1	—	6	—	—
S. agona	0,4	1	—	—	—	—

1.2.1. Salmonella typhimurium.

A l'origine d'une épidémie en milieu pédiatrique survenue en Algérie pendant l'année 1969 (179), **S. typhimurium,** responsable de gastro-entérites infantiles, est en fait ubiquitaire (192, 193) et frappe les individus à tout âge, particulièrement s'il y a baisse des défenses immunitaires.

La prédominance de **S. typhimurium** sur les autres sérotypes apparaît dans toutes les statistiques (105, 150, 158, 163), avec une fréquence qui varie selon les années et les foyers épidémiques.

Si en 1978, **S. typhimurium,** douée d'un pouvoir pathogène et épidémique élevé, représente pour QUENTIN (203) 20 p. 100 des cas de toxi-infections alimentaires, ce sérotype, le chef de file pour la majorité des auteurs, est en cause dans 25 à 45 p. 100 des cas, d'après CHARMOT et BRUMPT (56). Ainsi, pour GOUT et coll. (115), sur 300 cas colligés à Grenoble de 1974 à 1975, **S. typhimurium** est présente dans 40 p. 100 des salmonelloses mineures, pourcentage qui lui paraît supérieur à ceux de BAJOLLE et coll., BARDIE et coll. et ESTAVOYER et coll. (17, 19, 96) rapportés dans le tableau 3. Avec 16 cas en 1974, 33 en 1976 et 25 en 1977, **S. typhimurium** leur paraît même en progression. Les mêmes auteurs, pour qui ce sérotype se retrouve essentiellement en milieu hospitalier (tableau 6), constatent une augmentation dès les premiers mois de l'été, et une recrudescence hivernale, en collectivité pédiatrique, qui peut alors correspondre à des épidémies hospitalières.

Les observations de PEYRAMOND et BERTOYE (197) font apparaître également une prédominance de **S. typhimurium** par rapport aux autres sérotypes (tableau 4).

Fréquence des sérotypes selon les années, dans une même région.
d'après BERTOYE (197)

Tableau 4

	1975	1976	1977 (3 trimestres)	TOTAL PAR SEROTYPE
S. typhimurium	136	143	137	416
S. panama	29	33	34	96
S. brandenburg	18	42	8	68
S. wien	39	8	10	57
S. senftenberg	6	10	22	38
S. heidelberg	7	16	9	32
S. enteritidis	12	6	12	30
S. infantis	16	5	1	22
S. montevideo	8	8	5	21
Autres	57	88	87	232
TOTAL PAR AN	367	395	367	1012
S. typhi et **S. paratyphi**				117

1.2.2. Salmonella wien.

Ce sérotype a été largement étudié du point de vue épidémiologique à l'occasion d'une véritable épidémie survenue en milieu hospitalier pédiatrique. Jusqu'à il y a une dizaine d'années, **S. wien** pouvait encore figurer parmi les salmonelles insolites (162), n'ayant été isolée que de façon sporadique en Angleterre, en Belgique, aux Pays-Bas, en Autriche, en Allemagne, au Canada, en France.

Brusquement, en novembre 1969, est apparue une importante épidémie dans un service de pédiatrie à Alger. Celle-ci s'est alors propagée au nord du Sahara, puis en Grande Kabylie et enfin dans le Constantinois, avec une extrême gravité puisque, chez les nourrissons, la mortalité a pu atteindre 31 p. 100 (151, 195).

Au cours du premier semestre 1970, cette épidémie est passée du Maghreb en Europe méridionale et a ensuite largement diffusé en France (119, 161) et dans de nombreux pays de l'Europe, au Moyen Orient et jusqu'aux U.S.A. (57, 193) où l'on a pu retrouver des souches du même sérotype.

En France, d'abord signalée dans la région grenobloise à propos d'une épidémie hospitalière en 1970 dont le sérotype reste encore à l'origine de résurgences en 1975 (107), **S. wien** a été retrouvée à Troyes, Marseille, Toulon (38), Paris (89) et Lyon (197).

Ainsi, depuis cette épidémie exemplaire, BRISOU et coll. (38) ainsi que GUIBERT (119) notent la propagation de ce sérotype en France. De même, DOMART et coll. (89), à Paris, alors qu'aucune souche de **S. wien** n'avait été isolée en 1971, constatent l'augmentation du nombre de souches isolées : 8 en 1972, 21 en 1973, 18 pendant le seul premier trimestre 1974. En fait, nous verrons avec ces auteurs que les principaux problèmes épidémiologiques découlent des difficultés thérapeutiques.

Pourtant, en 1977, ce sérotype qui domine essentiellement en âge pédiatrique, sur le mode épidémique, paraît en régression, au moins dans la région grenobloise (107) où il est responsable de 25 p. 100 des cas de salmonelloses mineures, ce résultat encore élevé étant dû aux épidémies d'Algérie. Il semble cependant qu'avec GOUT et coll. (115), on puisse dire que cette régression logique se fait au profit de **S. typhimurium.**

1.2.3. Salmonella panama.

Depuis 1965, **S. panama** a été à l'origine de salmonelloses épidémiques en milieu pédiatrique (213) et l'on retrouve ce sérotype avec une fréquence significative, même si celui-ci ne prédomine jamais, dans les statistiques de BAJOLLE et coll. (17) concernant Reims ou dans celles de ESTAVOYER et coll. (96) concernant Besançon.

1.2.4. Autres sérotypes.

Après **S. typhimurium, S. panama** et **S. wien,** on trouve, parmi les 1 700 sérotypes du genre **Salmonella,** quelques autres sérotypes, dont la fréquence varie suivant le lieu (région) et le temps (date), et qui sont à l'origine d'épidémies infantiles de gastro-entérite. Nous citerons, à titre d'exemple :

- **S. stanleyville,** de 1967 à 1969, au Cameroun (97), qui est en recrudescence devant **S. typhimurium.**
- **S. isangi,** en 1969, au Zaïre, responsable d'une épidémie importante (151) et dont on retrouve actuellement le sérotype en France (164).
- **S. ordonez,** en 1971, au Sénégal (226).
- **S. saint-paul,** aux Etats-Unis, en Amérique centrale et du Sud, dont la létalité a pu dépasser 20 p. 100.
- **S. ibadan** responsable d'une épidémie dans un service de pédiatrie en janvier 1974 à Grenoble (115).
- **S. montevideo** responsable en juillet 1975 d'une toxi-infection alimentaire de 300 personnes (41).

D'autres sérotypes sont encore retrouvés sans qu'ils soient responsables d'épidémie de gastro-entérite infantile (164). Il s'agit de **S. brandenburg, S. heidelberg, S. dublin, S. orion, S. johannesburg, S. senftenberg, S. derby,** dont les dénominations montrent bien leur aspect local et particulier.

2. Résistance des salmonelles aux antibiotiques.

La gravité et l'extension des épidémies, tant à S. **typhi** ou S. **paratyphi** qu'aux autres salmonelles, tiennent au fait que ces épidémies ont toutes pour origine une souche résistant à au moins un antibiotique (203). On assiste à une résistance de plus en plus grande de ces bactéries. Cette évolution est due à la sélection qu'exercent les antibiotiques. Ces derniers favorisent en effet les sérotypes résistants au détriment des sérotypes sensibles (15). Certains sérotypes d'emblée multirésistants ont une potentialité épidémique plus élevée et peuvent alors poser des problèmes thérapeutiques importants (89), d'où la nécessité de maintenir une surveillance du niveau de résistance des salmonelles et de la diffusion des sérotypes multirésistants qui sont aptes à causer des épidémies.

2.1. S. typhi et S. paratyphi.

Depuis 1950, les quelques cas isolés de résistance de S. **typhi** et S. **paratyphi** n'avaient pas, d'après BAINE et coll. (16), sensibilisé le corps médical, et si, en 1970, on pouvait avec ACAR (1) estimer que S. **typhi** et S. **paratyphi B** conservaient une sensibilité originelle à l'ampicilline, au chloramphénicol, au triméthoprime et au sulfaméthoxazole, en 1978, on constate avec QUENTIN (203) que les souches résistant à l'un ou l'autre de ces antibiotiques ne sont plus exceptionnelles.

2.1.1. S. typhi.

C'est en 1967 que sont apparues les premières souches de S. **typhi** multirésistant à la streptomycine, au chloramphénicol, aux tétracyclines et aux sulfamides, avec un acmé en 1972 lors des épidémies survenues au Mexique et au Viet-Nam. Les souches de S. **typhi** isolées alors étaient résistantes au chloramphénicol (45, 108), mais, ce qui explique en partie la gravité de ces épidémies, l'étaient aussi à la streptomycine, aux tétracyclines, aux sulfamides et même à l'ampicilline (5, 51, 190).

Retrouvées ultérieurement tant en Suisse et en Angleterre qu'en France (51, 263), de telles souches peuvent faire craindre le pire, puisque non traitables.

S'il n'était pas d'usage, avant 1972, de déterminer la sensibilité de S. **typhi** aux antibiotiques, il a donc fallu depuis reconsidérer l'utilité et la nécessité de l'antibiogramme. Celui-ci confirme l'évolution générale des salmonelles vers la résistance et l'on ne peut plus minimiser le risque d'une épidémie à partir d'un foyer où la majorité des souches serait polyrésistante.

2.1.2. S. paratyphi.

La multirésistance de S. **paratyphi B** à l'ampicilline, à la streptomycine, au chloramphénicol, aux tétracyclines et aux sulfamides est connue depuis une quinzaine d'années. ACAR (1), JANBON et coll. (138) ainsi que CHABBERT et BAUDENS (52) ont en effet, dès 1965, pu montrer qu'un traitement initialement actif pouvait induire indirectement l'apparition de souches résistantes par transfert de la résistance depuis les bactéries saprophytes intestinales, spontanément résistantes et donc sélectionnées par l'antibiothérapie, à des salmonelles qui étaient sensibles au départ. CHABBERT (51) cite l'exemple d'un malade traité pour une fièvre typhoïde à S. **paratyphi B**, sensible aux antibiotiques et apparemment guéri, dont les selles ont permis d'isoler ensuite la même S. **paratyphi B** devenue résistante à 3 groupes d'antibiotiques, mais aussi des souches de **E. coli** et des klebsielles résistant aux mêmes antibiotiques.

En 1969, DINBAR et coll. (87) rapportent également un cas de rechute chez un malade cholecystectomisé, traité par l'ampicilline, et pour lequel il avait été isolé une S. **paratyphi B** ayant acquis une résistance multiple à l'ampicilline, à la streptomycine, à la sulfadiazine, au chloramphénicol et aux tétracyclines.

Dans une mise au point publiée en 1971, CHABBERT estime cependant que le pourcentage de **S. paratyphi B** résistant à un antibiotique au moins est faible, de l'ordre de 6,6 p. 100.

2.2. Autres salmonelles.

La résistance des autres salmonelles aux antibiotiques a fait l'objet de nombreuses enquêtes. Ainsi l'O.M.S. a étudié, en 1971, 1080 souches provenant de 12 centres nationaux européens qui participent de façon permanente au programme de surveillance des salmonelles et choisies de façon à constituer un échantillonnage représentatif. Ces souches appartenaient à 50 sérotypes différents, mais 90 p. 100 étaient représentés par 6 sérotypes seulement : **S. typhimurium, S. enteritidis, S. panama, S. heidelberg, S. dublin** et **S. brandenburg.** Ayant examiné leur résistance à l'ampicilline, à la streptomycine, à la néomycine, à la kanamycine, au chloramphénicol, aux tétracyclines et aux sulfamides, CHABBERT (51) conclut que 33 p. 100 des souches sont résistantes à un antibiotique au moins. Envisageant le nombre de groupes d'antibiotiques auxquels les salmonelles sont résistantes, c'est-à-dire le nombre de caractères de résistance, qui varie dans cette étude de 1 à 5, il constate qu'un tiers des souches résistant à un antibiotique au moins résiste à 4 antibiotiques ou plus :

nombre d'antibiotiques	1	2	3	4	5
pourcentage de résistance	43	12	12	27	6

Selon TANAKA et coll. (241), 68,3 p. 100 des salmonelles, autres que **S. typhi** et **S. paratyphi,** isolées au Japon entre 1955 et 1973 résistaient à un antibiotique, chiffre élevé qui s'explique par la résistance aux sulfamides, alors que 2,8 p. 100 seulement des souches résistaient à 4 antibiotiques.

En ce qui concerne notre pays, GLEDEL et coll. (112) ont montré également que, parmi les salmonelles d'origine animale isolées en 1974 et 1975, le pourcentage de souches résistantes est loin d'être négligeable. Pour ce qui est des souches d'origine humaine, AVRIL et BRIFFOD (14) ont montré en 1977, dans une étude portant sur 200 souches provenant du Centre National de Référence pour les salmonelles, que pour les dix sérotypes les plus fréquents, la résistance à l'ampicilline allait de pair avec une résistance à la carbénicilline, et, de façon moindre, aux céphalosporines. De même, les souches qui étaient résistantes aux tétracyclines l'étaient toujours à la minocycline.

Tableau 5 - d'après AVRIL et BRIFFOD (14)

auteur	année	origine	nombre de souches	pourcentage de résistance à 1 antibiotique	pourcentage de résistance à 4 antibiotiques
CHABBERT (51) OMS	1971	humaine	1080	33	10
TANAKA (241) Japon	1955-1973	humaine	1980	68	2,8
GLEDEL (112) France	1974-1975	animale	3624	28	2,7

Si la résistance au chloramphénicol, fréquente en de nombreux pays, paraissait encore rare en Amérique du Nord, en 1977, cette situation, selon GRANT et coll. (117, 118), aurait évolué depuis.

Considérés dans leur ensemble, ces faits peuvent ne pas apparaître comme dramatiques. En fait, toutes les souches résistant aux antibiotiques peuvent être à l'origine d'une épidémie. Il convient donc de situer leur importance.

2.2.1. S. typhimurium.

La notion de résistance de **S. typhimurium** aux antibiotiques est ancienne comme ne manquent pas de le souligner de nombreux auteurs qui notent également une augmentation de cette résistance.

Ainsi, QUENTIN et GUTMANN (203) remarquent un accroissement de la résistance aux antibiotiques de 1948 à 1962, avec, jusqu'en 1973, une sélectivité pour **S. typhimurium** dont 30 p. 100 des souches sont polyrésistantes contre 10 p. 100 pour les autres sérotypes, sans que le chloramphénicol soit en cause. Mais depuis, CHERUBIN et coll. (61) ont signalé en 1977 une résistance au chloramphénicol pour **S. typhimurium** et aussi les autres sérotypes.

AVRIL et BRIFFOD (14) en 1978, pour qui **S. typhimurium** est le sérotype le plus fréquent, ne manquent pas de souligner que sa résistance aux antibiotiques est l'objet d'une surveillance attentive. De fait, l'étude effectuée aux U.S.A. par le C.D.C. d'Atlanta montre une évolution de la sensibilité de **S. typhimurium** aux antibiotiques : si, en 1948, la totalité des souches était sensible à tous les antibiotiques, depuis cette date, le nombre des souches résistantes s'est accru régulièrement à un point tel que, d'après FALKOW (99), en 1962, 21 p. 100 des souches de ce sérotype résistaient à au moins un antibiotique.

Les travaux d'ANDERSON (3) montrent également une augmentation considérable du pourcentage de souches de **S. typhimurium** résistantes. Pour cet auteur, en 1961 et 1962, seulement moins de 3 p. 100 des souches étaient résistantes, alors que ce taux a atteint 61 p. 100 en 1964 et 1965.

ASERKOFF et BENNETT (10) ont fait, eux, mention en 1969 de 9,7 p. 100 de résistance acquise à un ou plusieurs antibiotiques chez 185 gastro-entérites à **S. typhimurium** traitées par le chloramphénicol ou l'ampicilline, et signalent l'absence d'effet du traitement sur le tableau clinique au cours d'une épidémie due à ce sérotype.

Plus récemment, en 1974, POHL et coll. (201), à l'instar d'ANDERSON, ont observé en Belgique la même augmentation du nombre de souches de **S. typhimurium** résistant à plusieurs antibiotiques, essentiellement pour les souches d'origine bovine : aucune des souches ne résistait à 5 antibiotiques en 1970 alors qu'en 1973, 78 p. 100 des souches isolées présentaient une résistance multiple à 5 antibiotiques.

Ainsi, même si chacun des auteurs peut estimer différemment la résistance de **S. typhimurium** aux antibiotiques, à cause de la diversité d'origine des souches étudiées, il faut bien attirer l'attention sur le fait que cette résistance gagne en pourcentage et que les nouveaux sérotypes multirésistants apparus peuvent être à l'origine d'épidémies graves puisque non jugulables par le traitement antibiotique devenu inefficace.

2.2.2. S. wien et S. panama.

On trouve dans la littérature deux sérotypes de salmonelles responsables d'épidémies de gastro-entérite dans les services de pédiatrie, et résistant aux antibiotiques :

S. panama, en 1965, dont la presque totalité des souches résistait à l'ampicilline et aux tétracyclines (96, 162, 213).

S. wien, responsable de l'épidémie survenue à Alger en 1969 et dont le sérotype s'est avéré d'emblée résistant à l'ampicilline, aux sulfamides, à la kanamycine, au chloramphénicol et aux tétracyclines. Cette résistance aux antibiotiques explique la gravité de l'épidémie observée et le danger potentiel que représente cette souche (119).

D'autres sérotypes multirésistants ont été l'origine d'épidémies survenues en Afrique noire depuis 1960. Ce fut le cas, en particulier, pour **S. stanleyville** (154) et **S. ordonez** (226).

2.3. Origine de la résistance aux antibiotiques.

2.3.1. Les plasmides de résistance.

D'après CHABBERT (51), une bactérie devient résistante à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d'une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique.

La résistance est gouvernée par des gènes localisés dans deux types de molécules de DNA :
- le chromosome bactérien qui apporte l'ensemble des informations propres à la cellule bactérienne,
- les plasmides qui sont des DNA bicaténaires, circulaires, fermés et surenroulés, étrangers à la cellule bactérienne, mais pouvant être introduits dans cette dernière par des mécanismes de transfert de DNA d'une bactérie à une autre, tels que la transduction ou la conjugaison (54).

Certains plasmides peuvent s'incorporer dans le chromosome bactérien et constituer ce qu'on appelle un épisome. Les plasmides de résistance, ou plasmides R, portent des gènes codant pour la synthèse d'enzymes capables d'inactiver un antibiotique ou un groupe d'antibiotiques, et rendant ainsi résistantes les bactéries qui les hébergent.

L'importance des plasmides R est liée à leur capacité d'autoréplication et de dissémination, mais également au fait que le traitement par un antibiotique tend à sélectionner les bactéries possédant un tel plasmide.

Les faits, ainsi que les caractéristiques des épidémies à salmonelles, pouvaient faire penser qu'un ou plusieurs plasmides R particuliers pouvaient conférer à ces bactéries des capacités épidémiques plus grandes (108). Une analyse génétique des plasmides R des sérotypes épidémiques, réalisée par AVRIL et CHABBERT (15), montre que les salmonelles épidémiques n'hébergent pas de plasmides R différents de ceux des autres entérobactéries. Cette constatation est à rapprocher d'observations cliniques (51, 54, 61, 87) où des salmonelles sensibles ont, au cours du traitement antibiotique, reçu les caractères de résistance des autres entérobactéries de l'intestin des malades. Les caractères de résistance acquis sont indépendants de l'antibiotique utilisé. Un seul antibiotique sélectionne des bactéries qui portent des plasmides codant pour la résistance à plusieurs produits, et favorise donc l'émergence de résistances multiples.

2.3.2. Plasmides de S. typhi et S. paratyphi.

L'étude des plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques des souches de **S. typhi,** provenant des épidémies du Mexique et du Viet-Nam et qui étaient résistantes aux mêmes antibiotiques, a été faite par ANDERSON et SMITH (5). Le rôle du plasmide R a été ainsi démontré puisque ces souches hébergeaient le même plasmide R, appartenant à un nouveau groupe d'incompatibilité H (53), alors qu'elles appartenaient à des lysotypes très divers.

Le plasmide a ainsi conféré à **S. typhi** un avantage épidémiologique, bien que sa signification sur le plan bactériologique ne soit pas encore parfaitement élucidée pour CHABBERT (51).

2.3.3. Plasmides des autres salmonelles.

2.3.3.1. Pour **S. panama,** les travaux de BOUANCHAUD et CHABBERT (36) montrent que la résistance de ce sérotype épidémique en 1965 et retrouvé depuis dans différents pays (192)

était codée par des plasmides R autotransférables entre ce sérotype et **E. coli** K 12. Les salmonelles des différentes épidémies possédaient l'un ou la totalité des 4 plasmides relevés par CHABBERT et coll. (55) et codant pour la résistance à l'ampicilline, la kanamycine, les tétracyclines. Elles hébergeaient en outre un facteur colicinogène plasmidique.

Ainsi, l'analyse effectuée par AVRIL et coll. (15) confirme les travaux précédents (36, 51), de même que ceux de MIZON et LECLERC (182). Ces derniers auteurs ont observé que les plasmides R issus des souches de **S. panama** isolées à des moments différents d'un même foyer épidémique sont identiques et peuvent donc constituer un marqueur épidémiologique supplémentaire. Au contraire, les souches d'un même sérotype, mais provenant de foyers divers, peuvent héberger des plasmides R différents.

2.3.2.2. Pour **S. wien,** responsable d'épidémies en Algérie puis en France (161, 179), la résistance aux antibiotiques était également déterminée par des plasmides autotransférables (51)

En fait, les exemples sont nombreux pour confirmer que la multirésistance de ces sérotypes épidémiques est due à la présence de plasmides R autotransférables provenant généralement de **E. coli** (15, 36, 161, 182). Ces plasmides permettent aux souches qui les hébergent de survivre soit dans l'intestin, soit dans le milieu extérieur en présence de concentrations élevées d'antibiotiques.

2.4. Conclusions thérapeutiques concernant l'antibiothérapie.

Devant l'augmentation du nombre des salmonelles résistant aux antibiotiques, on peut considérer, avec QUENTIN (203), que nous sommes revenus à l'ERE PREANTIBIOTIQUE. En 1979, l'opportunité de l'antibiothérapie est en effet chaque jour davantage discutée car les effets de cette dernière sont loin des résultats qu'on pouvait espérer.

2.4.1. Fièvres typho-paratyphoïdiques.

Le problème paraît ici moins important, car, si l'on a pu craindre un moment le pire du fait de la résistance plasmidique vis-à-vis du chloramphénicol, il existe actuellement de nombreux produits dont l'ampicilline et surtout le cotrimoxazole qui sont venus relayer le seul produit qui était véritablement actif.

2.4.2. Salmonelloses «non typhoïdiques».

Si l'antibiothérapie demeure obligatoire en cas de septicémie avec risque de complications, dans un nombre de cas non négligeable, on constate qu'elle est sans effet sur le malade bien qu'elle soit encore efficace **in vitro**. On peut donc penser avec MODAI et coll. (183) qu'un traitement antibiotique ne peut réussir que si les réponses immunitaires du sujet sont au moins partiellement conservées.

D'une façon générale, les gastro-entérites sont spontanément résolutives par le seul traitement symptomatique. D'autre part, comme l'a souligné MANTEN (174), les résultats obtenus **in vivo** sont souvent décevants du fait des multirésistances plasmidiques aux principaux antibiotiques. Ceci explique que de nombreux auteurs (29, 56, 115, 197, 203) préconisent une antibiothérapie de courte durée, réservée uniquement aux formes graves et chez les sujets fragilisés.

DOMART et coll. (89) vont dans le même sens en estimant que les antibiotiques ne permettent pas toujours de traiter un malade et que leur utilisation peut poser un problème dans la mesure où un malade apparemment guéri est susceptible d'éliminer dans ses selles une salmonelle devenue multirésistante, et donc capable de provoquer un réensemencement massif en collectivité.

3. Transmission et portage des salmonelles.

3.1. Transmission des fièvres typho-paratyphoïdiques.

3.1.1. Importance de l'eau.

La transmission des fièvres typho-paratyphoïdiques est essentiellement fécale soit directe, selon un mode de contamination manu portée, soit indirecte.

L'eau y joue un rôle primordial. Ainsi, les grandes épidémies urbaines de Lyon en 1928-1929 et de Zermatt en 1963 avaient pour origine une défaillance du réseau d'adduction d'eau. Mais bien des cas provoqués par des crudités souillées ou des coquillages avaient également pour cause indirecte une contamination hydrique.

3.1.2. Importance du portage.

L'homme est le seul réservoir connu ; il constitue d'autre part le maillon essentiel de la chaîne épidémiologique, soit qu'il s'agisse de l'homme malade ou atteint de formes frustres et mêmes inapparentes (celui-ci est d'autant plus dangereux qu'il n'est pas isolé), soit qu'il s'agisse de porteurs de germes convalescents, transitoires, chroniques, ou sains.

En fait, d'après MOSS, 60 p. 100 des porteurs de **S. typhi** ou **S. paratyphi** ont un antécédent de fièvre connu.

- les porteurs transitoires : 30 p. 100 des patients ont une coproculture positive en fin de traitement, et 10 à 15 p. 100 des cas sont encore positifs un mois après l'apyrexie, d'après RUSSEL et SANDERS (224).
- les porteurs chroniques : après une fièvre typhoïde ou paratyphoïde, environ 3 p. 100 des malades restent porteurs chroniques. Il est à noter que leur pourcentage augmente avec l'âge. De fait, les enfants sont moins fréquemment porteurs chroniques : de 0,6 à 1 p. 100 d'après RUBENSTEIN et TYNES, et l'on remarque que chez les porteurs chroniques, le portage est essentiellement vésiculaire.

Selon DINBAR et coll. (87), le traitement par le chloramphénicol n'a pas fait diminuer la fréquence des porteurs chroniques. Quant à ROBERTSON et coll. (220), ils notent à propos de typhoïdes à **S. paratyphi A** que l'on trouve des porteurs chez 7 p. 100 des malades traités par le chloramphénicol, chez aucun des malades traités par l'ampicilline et chez 3 p. 100 des malades traités par ces deux antibiotiques. SANDERS (224) aboutit à des conclusions inverses en ce qui concerne ces deux derniers antibiotiques, mais à partir d'un nombre d'observations plus restreint.

3.2. Transmission des salmonelloses «non typhoïdiques».

Les salmonelles, autres que **S. typhi** et **S. paratyphi,** sont très ubiquitaires. Face au réservoir animal, difficilement contrôlable, le réservoir humain semble modeste. Celui-ci, toutefois, prend son importance dans l'extension des épidémies trouvant leur origine dans la contamination des denrées alimentaires, lors des différents temps de leur manipulation (27, 46, 100, 137). La généralisation des procédés industriels de conservation ou de préparation des aliments représente un réel danger. Une défaillance dans la chaîne du froid qui assure le stockage et le transport des produits, favorise en effet la prolifération bactérienne et l'éclosion de foyers plus ou moins

étendus. L'analyse des épidémies survenues chez des passagers d'avions long-courriers en fournit de nombreux exemples.

Ainsi, présentes dans l'intestin de nombreux animaux sauvages, d'élevage ou même domestiques, les salmonelles, autres que **S. typhi** et **S. paratyphi,** peuvent être responsables de gastro-entérites, sans endotoxémie, mais se compliquant parfois de septicémie, avec ou sans localisations.

On peut donc, avec BASTIN (22) et de nombreux autres auteurs, distinguer deux modes de contamination :
soit, le plus souvent, par consommation d'aliments souillés,
soit, parfois, directement de personne à personne.

3.2.1. Contamination d'origine animale.

Il s'agit d'une contamination digestive, à prédominance estivo-automnale. Elle est responsable des cas d'épidémie familiaux ou collectifs (restauration) et se fait le plus souvent à partir de viande d'animaux de boucherie ayant pu être contaminés soit à l'élevage, soit dans le transport aux abattoirs, soit surtout au moment de l'abattage et de la préparation. Cette viande est un bon milieu de culture à la température ambiante, et le risque de contamination est alors d'autant plus grand que l'intervalle entre l'abattage et la consommation aura été plus long. La préparation industrielle facilite grandement la diffusion microbienne.

La contamination digestive peut se faire par les volailles et leurs œufs, les laitages, mais surtout par les viandes peu cuites (bœuf, cheval, porc, charcuterie) comme le rapportent BRISOU et coll. (41). Ces derniers considèrent même que le portage observé chez le personnel de l'alimentation a pour source principale la viande de boucherie. En accord avec d'autres auteurs, dont CATSARAS et coll. (49), ils estiment d'ailleurs que 2 à 10 p. 100 des échantillons prélevés sur les étals de boucherie sont contaminés (39).

Mais on a pu aussi incriminer les eaux polluées par les animaux, les salmonelles pouvant survivre longtemps dans les eaux ou les boues (182).

3.2.2. Contamination inter-humaine, «manu portée».

Ce mode de contamination à prédominance hivernale se retrouve surtout en milieu hospitalier, et le plus souvent dans les services pédiatriques. Il a pour origine des porteurs sains et pose un problème comparable à celui de l'infection à **E. coli** entéropathogène.

Cette transmission «manu portée» se fait alors, pour CHARCOT et BRUMPT (56), par le personnel soignant, lors de la manipulation du linge souillé par les selles d'un malade ou d'un porteur méconnu, voire même par voie aérienne.

3.2.3. Rapport entre les deux modes de contamination.

Au cours d'une étude portant sur quatre sérotypes différents, GOUT et coll. (115) ont apprécié la part relative de chacun de ces modes de contamination (tableau 6). Ils estiment que si **S. wien** et **S. ibadan** ont un point de départ hospitalier, avec une contamination manu portée, **S. typhimurium** et **S. panama** donnent lieu à des épidémies extra-hospitalières dont l'origine alimentaire est certaine. Toutefois, ces auteurs n'ont pas pu mettre en évidence un rôle de l'eau potable dans la dissémination de **S. panama,** contrairement à ce qu'avaient observé BRISOU et coll. (38) lors d'une épidémie survenue à Toulon en 1972.

Tableau 6

	mode de contamination	
sérotype	hospitalière	extra-hospitalière
S. wien	70	30
S. typhimurium	10	90
S. panama	5	95
S. ibadan	80	20

3.3. Portage des salmonelles.

Nous avons pu entrevoir déjà le problème que posent les porteurs de germes sur le plan épidémiologique. Si le porteur convalescent traité représente un risque connu qui peut être isolé, le porteur asymptomatique ou ignoré constitue une menace permanente pour les collectivités de sujets prédisposés (22), et alors, pour une part, entretient l'état endémique ou épidémique.

3.3.1. Les porteurs transitoires.

Ce sont ceux dont la coproculture se négative spontanément en moins d'un an.

ASERKOFF et DIXON (10, 88) estiment qu'en moins de 6 mois, la quasi totalité des porteurs est stérilisée. D'une façon générale, nous pouvons estimer avec PEYRAMOND et BERTOYE (197) que 50 p. 100 des sujets ont des coprocultures encore positives 2 semaines après la guérison clinique et seulement 15 p. 100 après 4 semaines.

En fait, cette catégorie de porteurs transitoires est formée de deux groupes, à savoir les convalescents de gastro-entérite et les porteurs sains découverts par examen systématique.

3.3.1.1. Les convalescents de gastro-entérite.

Pour BASTIN et DUPONT (22), il s'agit le plus souvent de nourrissons et d'enfants ayant présenté, selon les conditions épidémiologiques locales, une gastro-entérite à **S. typhimurium,** à **S. orianenburg,** à **S. panama** ou à **S. enteritidis.** Alors, même si le risque épidémique est réduit à quelques mois, on comprend qu'il soit très important dans les collectivités infantiles (crèches, pouponnières, services de pédiatrie).

3.3.1.2. Les porteurs sains découverts par examen systématique (40).

Au cours d'une enquête portant sur 1 137 coprocultures pratiquées de façon systématique, en 1975-1976, chez le personnel de l'alimentation, BRISOU et coll. (41) ont relevé un taux de portage transitoire compris entre 1 et 2 p. 100, en accord avec les statistiques de RENGA (Naples-Italie) et de PATERAKI (Grèce). Ce taux de porteurs sains qui est en nette augmentation pendant la saison estivo-automnale est donc loin d'être négligeable. Ces porteurs transitoires semblent constituer la source la plus fréquente de contamination dans les toxi-infections alimentaires à salmonelles, qu'il s'agisse de **S. montevideo** (41), de **S. typhimurium** (46) ou de bien d'autres encore.

3.3.2. Les porteurs chroniques.

Ce sont ceux qui excrètent des salmonelles pendant plus d'un an. Ce sont alors **S. typhi** et **S. paratyphi** que l'on retrouve le plus souvent dans les coprocultures.

Ces porteurs interviennent directement dans la diffusion du germe et des plasmides de

résistance. Il s'agit essentiellement de porteurs biliaires, notamment lithiasiques, pour lesquels l'ampicilline, nous l'avons déjà vu, permet souvent une stérilisation. Il est à noter cependant que la cholécystectomie, systématique pour certains, n'a pas empêché dans quelques cas la persistance du portage du germe (165).

3.3.3. Influence de l'antibiothérapie sur le portage.

Le traitement antibiotique crée le risque de favoriser une résistance acquise aux antibiotiques et de faire apparaître ainsi des salmonelles potentiellement plus pathogènes. Mais il convient d'ajouter à ceci qu'un tel traitement ne semble pas raccourcir la durée du portage.

DIXON (88), le premier, a étudié la durée d'excrétion de **S. typhymurium,** lors de deux épidémies infantiles survenues en 1954 et 1964, dans des conditions analogues. Il constate que, chez les enfants traités aux antibiotiques, la stérilisation des selles est obtenue moins rapidement. De plus, il note l'apparition dans ces dernières de salmonelles résistant aux tétracyclines.

De nombreux auteurs, dont ASERKOFF et ROSENSTEIN (10, 222) et aussi KAZEMI et coll. (146, 147) ainsi que CLEMENTI (66), ont démontré depuis que l'antibiothérapie augmentait la durée du portage.

Plus récemment, en 1977, COSTA et coll. (73), à partir d'une étude faite sur 146 cas, ont estimé que la coproculture reste positive en moyenne 7,1 jours en l'absence de traitement antibiotique, et 13,2 jours chez les sujets soumis à une antibiothérapie dirigée.

Pour BRUNEL et MODAI (42, 183), ce phénomène serait imputable soit à une action de l'antibiotique sur la muqueuse intestinale, soit à un remaniement profond de l'équilibre microbien intestinal (110, 173). On assisterait à une prolifération rapide des souches pathogènes résistantes du fait de la disparition de la flore intestinale normale, et en particulier des bactéries sécrétant des bactériocines capables de s'opposer au développement des germes pathogènes.

3.3.4. Essai d'éradication du portage.

Sur le plan épidémiologique, il est dangereux de tolérer l'émission régulière dans les fécès de bactéries porteuses de plasmides leur conférant une multirésistance. Ces plasmides sont en effet transférables et risquent donc de contaminer d'autres espèces de la flore intestinale.

Sur le plan pratique, un traitement antibiotique prolongé et théoriquement actif **in vitro** n'arrive pas toujours à stériliser les selles des patients. Non seulement il ne paraît pas accélérer la guérison, mais encore il peut accroître la durée du portage.

Toutes ces considérations amènent de nombreux auteurs (41, 56, 197, 258) à recommander l'abstention d'antibiothérapie pour une éradication du portage plus efficace.

Il faut signaler à ce propos les résultats positifs d'HOFFMANN (123) par administration de cures répétées de lactulose. Malgré tout, le traitement des porteurs sains représente toujours un problème épidémiologique important, même s'il n'est pas aussi aigu dans le cas des salmonelles non typhoïdiques que dans celui de **S. typhi** et **S. paratyphi.** Pour CLEMENTI (66), le triméthoprime-sulfaméthoxazole, en cure de deux semaines, donnerait également des résultats probants en raccourcissant significativement le portage.

4. Aspects cliniques des salmonelloses «non typhoïdiques».

Après avoir considéré l'épidémiologie récente, dépendant essentiellement de la résistance aux antibiotiques et du mode de contamination où les porteurs ont un rôle important, nous ne pouvons clore l'actualité des salmonelloses «non typhoïdiques» sans faire mention des tableaux cliniques sous lesquels elles se présentent actuellement (32).

4.1. Principales formes cliniques.

4.1.1. Les gastro-entérites.

Elles correspondent aux toxi-infections alimentaires, fréquentes, même si le recensement est incomplet. Leur gravité est modérée, la mortalité ne dépassant pas 1 p. 100 (27).

4.1.2. Les manifestations extra-digestives.

Leur fréquence est moindre, difficile à estimer. Elles représentent 4,7 p. 100 des cas recensés de gastro-entérite pour SUERI et coll. (239), et 31 p. 100 des cas pour GRENIER et coll. (18).

Leur gravité importante tient à la résistance des salmonelles aux antibiotiques, mais aussi au terrain sur lequel elles surviennent (28).

4.1.2.1. Les formes septicémiques.

Elles se présentent soit sous la forme rare mais classique de dothienenterie (197), soit sous forme de septicémie isolée (60, 196). L'estimation de leur fréquence varie considérablement suivant les auteurs, de 5 à 25 p. 100 des cas.

Ainsi pour LASFARGUES et coll. (157) et CHERUBIN et coll. (60), les formes septicémiques représentent 5 p. 100 des gastro-entérites à salmonelles. SAPHRA et coll. (225) estiment qu'elles représentent 7,2 p. 100 et, MODAI et DOMART (183) 12 p. 100.

Certains auteurs français (18, 28) leur accordent une fréquence nettement supérieure, soit 25 p. 100.

Ces divergences sont expliquées par un recueil des données tout différent, selon que les statistiques sont établies à partir de cas recensés dans des services hospitaliers très divers ou à partir des cas hospitalisés dans un service de pathologie infectieuse.

L'évolution létale de ces formes septicémiques, estimée à 15 p. 100 (183), est avant tout le fait de patients présentant une affection maligne.

4.1.2.2. Les autres formes.

On peut avec PEYRAMOND et coll. (197) distinguer :
- les formes pleuro-pulmonaires : 30 p. 100 chez le vieillard ;
- les formes neuro-méningées : 18 p. 100 chez le nouveau-né et l'adulte ;
- les formes ostéo-arthritiques : elles sont fréquentes chez l'adulte (115, 249) et se voient surtout chez des sujets sicklanémiques, avec l'incidence particulière de **S. typhimurium** (250) ;
- les formes cardio-vasculaires : elles sont rares, avec une prépondérance de **S. choleraesuis** (44) ;
- les formes uro-génitales : elles sont rares et compliquent un problème pré-existant ;
- les métastases septiques au niveau des parties molles (28).

4.2. Importance du sérotype.

Ces différentes formes cliniques nous amènent tout naturellement à discuter la responsabilité du sérotype.

Pour GOUT et coll. (115), **S. wien** et **S. typhimurium** sont les deux sérotypes responsables des gastro-entérites graves. La pathogénicité du sérotype est également avancée par AUBERTIN et coll. (12) pour qui **S. choleraesuis** et **S. orianenburg** sont responsables de 30 p. 100 des septicémies alors que **S. typhimurium** et **S. enteritidis** ne représentent que 5 p. 100 des hémocultures positives.

Si, pour LE MINOR et coll. (163), nous avons par ordre de fréquence décroissant : 1. **S. typhimurium,** 2. **S. wien,** 3. **S. panama,** 4. **S. dublin,...** 7. **S. enteritidis,** CHERUBIN et coll. (59, 60), à partir des formes septicémiques, établissent un classement différent avec 1. **S. choleraesuis,** 2. **S. orianenburg,** 3. **S. entiritidis.**

En fait, pour PEYRAMOND et coll. (197) comme pour MODAI et coll. (183), il ne semble pas qu'un quelconque sérotype puisse être responsable de forme préférentielle, même si **S. choleraesuis** est apte à déterminer des manifestations sévères, septicémiques ou cardio-vasculaires (124).

Cette différence est en effet la conséquence d'un recrutement différent. Nous pouvons avec ces derniers auteurs avancer que le sérotype présente essentiellement un intérêt épidémiologique et que seul le terrain pré-existant est responsable de la gravité évolutive particulière de telle ou telle forme clinique.

4.3. Importance du terrain.

On comprend donc ainsi que si le sérotype ne semble effectivement pas être responsable de la forme clinique ni de sa gravité, deux facteurs essentiels conditionnent une sensibilité particulière : d'une part l'âge, tant chez les nourrissons chez qui le système immunitaire est encore immature que chez les vieillards, d'autre part les états morbides pré-existants, au cours desquels l'immunodépression est accentuée.

4.3.1. L'âge.

Les salmonelloses «digestives» se voient surtout avant l'âge d'un an. Leur fréquence diminue et se stabilise pour remonter chez les sujets âgés (56). CHERUBIN et coll. (58), à partir de 5864 cas, on pu estimer que si la mortalité était inférieure à 1 p. 100 chez l'adulte, celle-ci était de 3 p. 100 chez les nourrissons et de 28 p. 100 chez les sujets de plus de 60 ans.

Trois études françaises récentes (42, 96, 155) concernant les salmonelloses digestives infantiles en milieu hospitalier font apparaître la grande fréquence de quatre sérotypes, répartis différemment selon les régions. Il s'agit de **S. typhimurium, S. wien, S. panama** et **S. orianenburg.** La répartition dans le temps fait apparaître les pics d'épidémie et révèle alors que **S. typhimurium** est l'élément permanent de l'épidémiologie, avec une fréquence de 60 p. 100 (42).

De même, RYDER et coll. (223) font état de 30 à 150 coprocultures positives pour 100000 chez le jeune enfant, alors que la moyenne générale est de 12 p. 100000. **S. typhimurium** prédomine alors avec 28 p. 100 des résultats positifs.

L'enfant est victime du mode de contamination alimentaire, mais surtout du mode de contamination manu portée ou d'origine fécale (257) qui s'observe, selon SEPETJIAN et coll. (228) 8 à 9 fois sur 10. Ce mode de contamination est particulièrement fréquent dans les services de pédiatrie surchargés.

Ces épidémies et contaminations sont d'autant plus courantes qu'un petit nombre de germes seulement peut suffire à provoquer une salmonellose chez l'enfant : quelques dizaines de bactéries ont ici les mêmes effets (169, 170) que 10^5 germes chez l'adulte (128).

4.3.2. Les états morbides pré-existants.

Dans certaines affections au cours desquelles il y a une déficience immunitaire constante, provoquée par la maladie ou la thérapeutique, les cas de salmonelloses «non typhoïdiques» ne sont pas rares. Le rôle du terrain, comme pour les enfants, est donc déterminant puisque de nombreux auteurs insistent sur la fréquence d'une tare sous-jacente chez les sujets présentant une salmonellose septicémique. Cette tare sous-jacente est retrouvée dans 50 p. 100 (58, 59, 115) à 75 p. 100 des cas (18, 249).

4.3.2.1. Les néoplasies.

Les formes septicémiques des salmonelloses représentent alors 35 p. 100 des cas (183), ce qui est nettement supérieur aux valeurs retenues précédemment.

On retrouve essentiellement, parmi ces néoplasies, les hémopathies malignes où la prédominance de **S. typhimurium** est relevée par de nombreux auteurs (120, 153, 227, 267) et aussi les néoplasies digestives.

4.3.2.2. Les traitements immuno-dépresseurs.

De nombreux exemples de salmonelloses ont été observés au cours des transplantations rénales (4, 37, 91, 98, 189). On y retrouve une prédominance de **S. typhimurium.** Ce sérotype est d'ailleurs souvent à l'origine de septicémies et présente un caractère rebelle à la thérapeutique, voire récidivant.

4.3.2.3. Les autres états.

Les salmonelloses ont été observées également, associées à la collagénose (227), à la drépanocytose (249), aux schistosomoses (152), mais aussi dans la chirurgie digestive, le diabète et la cirrhose.

5. Conclusion.

Ce survol de l'actualité des infections à salmonelles montre que celles-ci sont en nette augmentation. Ce sont les salmonelles autres que **S. typhi** et **S. paratyphi** qui prédominent. Elles acquièrent, dans une proportion inquiétante, une multirésistance plasmidique qui rend le traitement antibiotique aléatoire et dangereux. De plus, la transmission et le portage des salmonelles sont inévitables. En effet, la prophylaxie non spécifique, reposant sur des mesures d'hygiène soit individuelle, soit collective, est insuffisante et décevante, comme en témoigne le nombre de cas recensés.

L'existence de vaccins à la fois efficaces et commodes à utiliser, tant chez les êtres humains que chez les animaux, permettrait d'améliorer la prévention des fièvres typhoïdes et des salmonelloses, devenues de plus en plus difficiles à traiter.

CHAPITRE II

POSSIBILITES D'AMELIORATION DE LA PREVENTION VACCINALE

1. Choix du critère d'efficacité.

1.1. Insuffisance de la notion classique d'antigénicité.

L'absence de critère d'efficacité indiscutable a considérablement entravé les progrès de la vaccination antitypho-paratyphoïdique, et plus particulièrement de l'immunisation par voie buccale. Mais il faut reconnaître que le problème est loin d'être simple.

Soulignons tout d'abord que l'idée d'attribuer l'efficacité d'un vaccin antitypho-paratyphoïdique à la production d'anticorps spécifiques est absolument gratuite et sans fondement expérimental. Si les anticorps antitoxiques peuvent être considérés comme étant le support exclusif de l'immunité acquise dans la vaccination antidiphtérique ou antitétanique, si les anticorps neutralisants représentent également l'essentiel du support de l'immunité acquise dans le cas des vaccins antiviraux, on sait depuis longtemps qu'il n'existe aucun parallélisme entre le taux des anticorps agglutinants anti-O, anti-H ou anti-Vi, les seuls que l'on sache mettre en évidence dans le cas des salmonelles, et le degré de l'immunité acquise vis-à-vis de ces bactéries. Les observations permettant d'étayer cette conclusion sont aujourd'hui nombreuses. Elles ont été suffisamment discutées par COLOBERT (72), IVANOFF et coll. (130, 134, 136) ainsi que par BRUNOT (43) pour qu'il ne soit pas nécessaire d'y revenir ici.

Pour le moment, le seul critère valable d'efficacité demeure donc la protection de l'individu ou de l'animal vis-à-vis de la bactérie infectieuse homologue. Nous examinerons successivement les principaux moyens permettant de mesurer cette protection.

1.2. Essais contrôlés sur le terrain.

Ils consistent essentiellement à comparer les pourcentages d'individus vaccinés et d'invidus non vaccinés échappant à l'infection en zone d'endémie. Avant même d'aborder le problème de l'efficacité du vaccin TAB, on peut souligner avec RENDU (216, 217, 218) que les conclusions fondées sur les résultats des premières vaccinations étaient trop optimistes dans la mesure où, la vaccination se prolongeant au-delà de l'épidémie, on considérait ensuite comme immunisés des sujets qui n'avaient couru aucun risque de contamination.

Les conditions, pour que les études portant sur l'immunisation active de groupes de populations conduisent à des résultats valables, ont été définies par COCKBURN en 1955 (67). Elles impliquent l'existence de plusieurs groupes de sujets «traités» et de sujets «témoins», les

premiers recevant le vaccin, les seconds une substance thérapeutiquement inactive, mais donnant, dans la mesure du possible, une réaction locale analogue. Elles supposent également l'existence de similitudes étroites entre les groupes témoins et traités quant à l'âge des sujets, aux maladies intercurrentes et aux risques de contamination.

Il est évident que de tels essais sont très lourds sur le plan de la logistique et qu'ils ne présentent un intérêt qu'à condition d'être effectués en zone d'endémie ou d'être suivis, dans un délai convenable, de l'éclosion d'une épidémie.

En ce qui concerne la vaccination de masse antityphoïdique, on dispose de plusieurs exemples où les conditions expérimentales permettaient une interprétation statistique correcte (80, 81, 83, 269, 270). Le plus intéressant est celui de l'épidémie survenue à PRISTINA en 1962 dans une population où 15000 volontaires avaient été vaccinés deux ans auparavant. Ces volontaires avaient été répartis en trois groupes dont le premier avait reçu un vaccin inactivé par la chaleur, le second un vaccin inactivé par l'acétone et le troisième, servant de témoin, de l'anatoxine diphtérique. Nous reviendrons plus loin sur les résultats de cette expérience qui ont été largement commentés par la Commission Yougoslave de la Typhoïde (270).

1.3. Epreuve sur volontaires.

La meilleure façon de contrôler la qualité des vaccins destinés aux humains consiste à administrer, par voie buccale, à des groupes de volontaires vaccinés, une dose d'épreuve de la bactérie pathogène homologue, puis à comparer les pourcentages de protection observés pour chaque groupe. C'est ainsi que HORNICK et coll. (126, 128) ont étudié comparativement le pouvoir protecteur de deux vaccins inactivés préparés à partir de **S. typhi.** GILMAN et coll. (111) ont utilisé également cette méthode pour vérifier le caractère immunogène d'un mutant R de la même bactérie. Dans ces expériences, l'efficacité du vaccin est jugée en fonction de l'incidence de la maladie.

Les précautions multiples que nécessitent de tels essais ne permettent cependant pas l'utilisation d'un grand nombre d'individus. D'autre part, l'obligation de recourir à une antibiothérapie efficace dès l'apparition des premiers symptômes de l'infection enlève au critère d'efficacité une partie de sa valeur. On ne connaît pas en effet le nombre de malades capables de guérir sans traitement.

1.4. Utilisation d'un modèle animal.

La mesure de la protection active d'un animal vis-à-vis d'une dose létale de salmonelles pathogènes administrée par voie buccale représente pour IVANOFF et coll. (130, 134) la méthode à la fois la plus commode et la plus probante pour étudier l'efficacité des vaccins. En utilisant un nombre suffisamment grand d'animaux, on peut en effet connaître de manière statistiquement significative l'influence des principaux paramètres, qu'il s'agisse de la nature du vaccin, de la voie d'introduction, de la quantité d'antigène administrée ou du rythme de vaccination.

Il n'est malheureusement pas facile de trouver des animaux chez lesquels on puisse reproduire les conditions naturelles et les caractéristiques cliniques de certaines infections humaines à salmonelles.

L'ingestion de **S. typhi** pouvant provoquer une infection intestinale chez certains singes anthropoïdes, CVJETANOVIC et coll. (82) se sont servis du chimpanzé pour vérifier l'efficacité d'un vaccin antityphoïdique vivant. Pour des raisons évidentes de prix de revient et de difficultés de manipulation, il n'est cependant pas possible d'envisager l'utilisation de tels animaux en grand nombre.

Les infections murines à **S. typhimurium** et **S. enteritidis** constituent les modèles les plus commodes pour l'étude de la vaccination contre la fièvre typhoïde et les salmonelloses. Elles

permettent en effet l'utilisation de lots importants d'animaux. D'autre part, leur pathogénie semble bien cadrer avec celle des infections humaines (191).

La comparaison des modèles expérimentaux faite par BRUNOT (43) montre qu'effectivement les résultats à la fois les plus nombreux et les plus probants proviennent d'études réalisées sur les souris à l'aide de **S. typhimurium** et **S. enteritidis.** L'extrapolation à **S. typhi** et **S. paratyphi** des données ainsi obtenues suppose malgré tout un minimum de vérifications effectuées sur l'homme.

DIENA et coll. (84, 85, 86) ont proposé depuis 1973 une méthode séduisante permettant de vérifier directement sur la souris l'efficacité des vaccins antityphoïdiques. Elle consiste à éprouver l'animal à l'aide d'une souche bactérienne hybride de **S. typhi** et **S. typhimurium** possédant les caractéristiques antigéniques de la première tout en conservant la virulence de la seconde. Les résultats obtenus en utilisant de tels hybrides varient largement suivant les espèces de souris utilisées. Ils sont pour l'instant trop peu nombreux pour qu'on puisse se prononcer sur la valeur d'un tel modèle expérimental.

Notons que des essais cohérents ont été également effectués sur les poulets à l'aide de **S. gallinarum** (232), sur les veaux à l'aide de **S. dublin** (233) et sur les porcs à l'aide de **S. choleraesuis** (233). Il s'agit cependant de modèles expérimentaux moins intéressants que les infections murines.

2. Valeur des vaccins inactivés injectables.

2.1. Efficacité relative du vaccin TAB.

Il est incontestable que la protection conférée par les vaccins antitypho-parathyphoïdiques inactivés n'a qu'un caractère tout à fait relatif. Ceci ressort en particulier de l'étude de la répartition des 128 cas de typhoïde survenus à PRISTINA en 1962 (270). La proportion fut de 3,2 p. 1000 dans le groupe d'individus vaccinés à l'aide du vaccin inactivé par l'acétone, de 7,3 p. 1000 dans le groupe vacciné à l'aide du vaccin chauffé et de 14,9 p. 1000 dans le groupe témoin, qui avait reçu de l'anatoxine diphtérique.

Au cours de l'épidémie qui sévit à Lyon en milieu militaire en janvier-février 1954, et dont l'étude a été effectuée par FERRABOUC et BERNARD (101), sur les 158 sujets atteints, 137 avaient été récemment et correctement vaccinés, 10 de manière incomplète et 11 pas du tout, la morbidité étant de 6,4 p. 100 dans la première catégories, de 7,9 p. 100 dans la seconde et de 14,7 p. 100 dans la troisième.

Faisant le bilan des épidémies survenues dans les troupes françaises d'Afrique du Nord, entre 1955 et 1962, BERNARD et coll. (24) notent également que sur les 1078 cas de typhoïde recensés, 66 p. 100 concernaient des sujets correctement vaccinés.

Les résultats obtenus sur des volontaires par HORNICK et coll. (126, 128) montrent aussi que les vaccins inactivés ne protègent pas les individus contre une dose d'épreuve supérieure à 10^5 bactéries pathogènes. Lorsque la dose inférieure ne dépasse pas une D.L.25, l'immunité observée chez les sujets vaccinés n'a qu'un caractère relatif.

D'après les estimations de la Commission Yougoslave de la Typhoïde, la protection conférée par les meilleurs vaccins classiques ne dépasse pas 70 p. 100 (270). Certes, des solutions ont été proposées pour tenter d'améliorer les résultats de la vaccination TAB (72, 101, 159). Mais, il ne semble pas que l'on puisse attendre grand chose d'une modification quelconque de la technique vaccinale, encore que le protocole actuel de vaccination ait été choisi uniquement en fonction de la montée des anticorps circulants, c'est-à-dire d'un très mauvais critère d'efficacité.

Notons aussi que de nombreux auteurs ne manquent pas de faire remarquer que la maladie elle-même n'est pas complètement immunisante. Ainsi, MARMION et coll. (177) observent 20 p. 100 de rechutes lors d'une deuxième épidémie survenant quelques mois après la première, tandis que HORNICK (128), ayant réexposé des volontaires à la même souche bactérienne, douze mois après une première typhoïde dûment constatée, relève 25 p. 100 d'atteintes cliniques.

De tels arguments ne doivent pas nous amener à conclure à l'impossibilité d'améliorer la prévention vaccinale des fièvres typho-parathyphoïdiques. En effet, la maladie ne confère pas forcément la meilleure immunité.

2.2. Résultats observés sur les animaux.

Les meilleurs modèles expérimentaux auxquels on puisse se référer pour juger de l'efficacité des vaccins inactivés sont les essais pratiqués sur les souris à l'aide de **S. typhimurium** et **S. enteritidis.** Les conclusions de ces études sont assez contradictoires. Comme le note BRUNOT (43), ceci provient essentiellement du fait que les paramètres expérimentaux ne sont pas toujours choisis de manière optimale, qu'il s'agisse de la dose d'épreuve de bactéries pathogènes, de l'intervalle de temps séparant l'épreuve de la vaccination, mais surtout de la voie d'administration de la bactérie pathogène.

S'il apparaissait clairement que les vaccins inactivés prolongent la durée moyenne de survie des souris ayant reçu une dose d'épreuve de bactéries pathogènes par voie intrapéritonéale, cette prolongation ne va pas forcément de pair avec une diminution du taux de mortalité (214, 244). D'autre part, les vaccins ayant entraîné une réduction de la mortalité des souris éprouvées par voie intrapéritonéale se révèlent incapables de protéger les animaux, si ces derniers sont éprouvés par la voie orale, qui est la voie naturelle de l'infection (78, 79, 172).

2.3. Obstacles à l'utilisation des vaccins inactivés.

Si la manipulation ou la conservation des vaccins inactivés ne pose aucun problème particulier, l'injection de ces vaccins n'est pas toujours sans danger pour les sujets qui les reçoivent, comme le montre l'analyse des incidents et accidents de la vaccination TAB-DT faite par BRUNOT (43). Sans doute est-il permis d'estimer avec H.M. ANTOINE et R. NICOLLE (6) que les troubles post-vaccinaux sont en général insuffisants pour justifier la suppression complète de cette vaccination. Il n'en demeure pas moins que les douleurs locales et générales consécutives à l'injection sont loin d'être négligeables. Elles expliquent pourquoi un grand nombre de sujets préfèrent se passer de ce mode de protection. De toute façon, la vaccination TAB-DT entraîne une indisponibilité dont la durée réglementaire est fixée, en France, à 48 heures.

Il convient de souligner par ailleurs que ce type de vaccin est contre-indiqué pour les sujets débilités, ceux qui présentent des antécédents de néphropathies et d'albuminurie isolée, ceux qui souffrent d'asthme ou de maladies allergiques, enfin pour les femmes enceintes (43).

3. Supériorité des vaccins buccaux.

3.1. Vaccins inactivés.

3.1.1. Chez l'homme.

L'idée d'administrer les vaccins antityphoïdiques par voie buccale n'est pas récente, comme en témoignent les études bibliographiques effectuées par IVANOFF et coll. (130, 134) ainsi que par BRUNOT (43). Les premiers résultats obtenus en France au début du siècle, grâce à l'utilisation du bilivaccin de BESREDKA (30, 31) ou de l'entérovaccin de LUMIERE et CHEVROTIER (171), avaient semblé encourageants. La théorie humorale de l'immunité ayant

ensuite triomphé sur la théorie cellulaire, on prit l'habitude de juger l'efficacité des vaccins d'après la montée du taux des anticorps circulants. Ce critère dépourvu de fondement expérimental sérieux favorisa l'usage des vaccins injectables au détriment de celui des vaccins buccaux. Depuis une douzaine d'années, ces derniers connaissent cependant un net regain d'intérêt. Certes, les résultats obtenus chez l'homme grâce aux vaccins inactivés n'ont pas toujours été très convaincants. HORNICK (128) d'abord n'a pas pu mettre en évidence une protection chez des volontaires éprouvés six mois après avoir reçu des tablettes de vaccin monovalent. DUPONT (90) reprenant la même expérience a obtenu des résultats positifs, mais après avoir doublé la dose de vaccin. L'utilisation d'un vaccin antityphique-paratyphique associé a permis également à GRAHNEIS (116) d'observer une protection en zone d'endémie. Si BERGOND (33, 34) et ASHCROFT (11) concluent aussi à l'efficacité des vaccins inactivés, CHUTTANI (62, 63, 64) et HEJFEC (121, 122) se montrent plus réservés dans leur jugement.

3.2.1. Chez l'animal.

Le système modèle que constituent la souris et son agent pathogène naturel **S. typhimurium** apporte ici encore des données intéressantes. Des nombreuses expériences citées par IVANOFF et coll. (130, 134) et par BRUNOT (43), nous retiendrons spécialement celles où la dose d'épreuve de bactéries virulentes est donnée par voie buccale. Ainsi, les travaux d'IVANOFF, CREACH et FONTANGES (103, 133) montrent que les meilleurs résultats, dans le cas des vaccins inactivés, sont obtenus en immunisant les souris quotidiennement pendant cinq jours consécutifs. Lorsque la dose d'épreuve est élevée (10^6 bactéries pathogènes), les taux de survie des animaux vaccinés sont relativement faibles, bien que leur durée moyenne de survie soit augmentée de manière significative. Si la dose d'épreuve est inférieure à 10^6 bactéries, la protection conférée par le vaccin apparaît plus nettement.

Pour RAETTIG (210) aussi, les vaccinations répétées à intervalles rapprochés donnent de meilleurs résultats qu'une vaccination unique ou suivie d'un rappel. D'après WALDMAN (262), l'efficacité des vaccins inactivés pourrait encore être améliorée par l'adjonction d'adjuvants.

3.2. Vaccins vivants.

C'est surtout l'emploi, comme vaccins, de bactéries vivantes avirulentes qui a permis de démontrer la nette supériorité de l'immunisation par voie buccale. L'OMS (191) subordonne l'utilisation des vaccins vivants à trois critères essentiels qui sont : une innocuité raisonnable, une efficacité certaine et un non-retour à la virulence. Parmi les nombreuses souches bactériennes susceptibles d'être retenues (191), ce sont les mutants streptomycino-dépendants (Smd) et les mutants présentant des modifications au niveau de l'antigène somatique O qui ont eu le plus souvent la faveur des expérimentateurs.

3.2.1. Chez l'homme.

Des essais de protection contre une dose d'épreuve de bactéries pathogènes donnée par voie orale ont été réalisés chez des sujets volontaires par HORNICK et coll. (127), LEVINE et coll. (166) et récemment par GILMAN et coll. (111), soit à l'aide d'un mutant de **S. typhi** streptomycino-dépendant, soit à l'aide d'un mutant R de la même espèce, dépourvu d'UDP-glucose 4-épimérase, et donc incapable de synthétiser un antigène O complet. Les taux de protection observés varient entre 66 et 87 p. 100 suivant les expériences. Il convient de souligner que, pour vacciner efficacement le mutant Smd doit être administré en association avec la streptomycine, tandis que le mutant R doit avoir été cultivé en présence de galactose. Il apparaît donc que le pouvoir immunogène de ces vaccins est lié à leur capacité de survie dans l'organisme. La nécessité d'une stimulation antigénique prolongée pour permettre le développement de l'immunité cellulaire a déjà été soulignée par COLLINS (69), par GERMANIER (109) et par IVANOFF (130, 134).

3.2.2. Chez l'animal.

A de rares exceptions près (86, 237), tous ceux qui ont essayé les vaccins entériques vivants chez les animaux concluent à l'efficacité de ces vaccins.

Les études faites sur la souris par détermination du pourcentage des animaux survivant à une dose létale de **S. typhimurium** mettent en évidence la nette supériorité des vaccins vivants par rapport aux vaccins inactivés (103, 130, 135, 149, 172, 230, 243, 265). Ainsi, les taux de survie à une dose infectieuse tuant 100 p. 100 des témoins varient de 60 à 100 p. 100 avec les vaccins vivants, alors qu'ils ne sont que de 30 à 50 p. 100 avec les vaccins inactivés essayés en parallèle. On peut noter, par ailleurs, que chaque fois que le vaccin et la bactérie d'épreuve sont de même espèce, la voie orale se montre supérieure à la voie parentérale pour l'immunisation (68, 130, 135, 149, 172, 243).

Les résultats observés chez les autres animaux, qu'il s'agisse des poules (8, 232) ou des singes anthropoïdes (82) sont également très favorables dans l'ensemble. Si STASILEVITCH et coll. (237) n'ont observé qu'une diminution de la gravité et de la durée de l'infection chez le chimpanzé vacciné à l'aide de mutants Smd de **S. typhi,** CVJETANOVIC (82) a montré qu'on pouvait parfaitement protéger l'animal à condition d'associer la streptomycine au vaccin.

3.3. Autres avantages des vaccins buccaux.

Dans le cas des salmonelles, les vaccins buccaux présentent sur les vaccins injectables un certain nombre d'autres avantages qui sont liés à l'utilisation de la voie orale. Ces derniers ont été énoncés par RAETTIG (209, 211) et peuvent se résumer de la manière suivante :
1 - le contact de l'antigène avec la muqueuse provoque **in situ** la formation d'anticorps capables de neutraliser ultérieurement l'agent pathogène arrivant à ce niveau.
2 - à côté de la défense spécifique, la vaccination locale stimule l'immunité non spécifique.
3 - contrairement à la vaccination parentérale qui peut conduire à des réactions d'intolérance ou favoriser des affections latentes, la vaccination entérale ne présente pas de contre-indications.
4 - en cas de catastrophe ou de menace d'épidémie, elle se prête mieux à la vaccination de masse ; elle ne nécessite pas de personnel spécialisé, elle est plus facilement acceptée que l'immunisation par injection ; enfin l'immunité qu'elle confère est très rapide.
5 - la vaccination par voie orale permet l'utilisation de vaccins secs, de conservation pratiquement illimitée.

4. Intérêt des constituants bactériens purifiés.

L'emploi des vaccins vivants pose un problème de maintien de la viabilité des bactéries qui, pour l'instant, ne semble pas avoir été entièrement résolu, dans le cas des salmonelles. Les résultats obtenus par LEVINE (166) en utilisant chez l'homme un vaccin lyophilisé ont été en effet décevants.

D'autre part, certains individus qui craignent le retour à la virulence ou la toxicité des souches mutantes demeurent hostiles, par principe, à l'usage des vaccins vivants, bien que de nombreuses études aient démontré la grande stabilité génétique des souches habituellement utilisées (95, 111, 166, 168, 176, 229, 259, 260).

L'utilisation de constituants bactériens purifiés, à condition que ces derniers soient actifs par voie buccale, résoudrait de manière satisfaisante le problème de la vaccination contre les salmonelles.

Il reste à voir ce que l'on sait de la nature chimique et de la localisation cellulaire de l'antigène vaccinant. C'est une question qui a été largement exposée par BRUNOT (43). Nous en dégagerons les idées essentielles, en y ajoutant les données bibliographiques plus récentes.

4.1. Inefficacité des antigènes connus.

On connaît bien aujourd'hui les méthodes d'extraction, la nature chimique et les propriétés biologiques des antigènes O, H et Vi des salmonelles, et celles de l'«antigène commun» des entérobactéries (ECA). Aucun de ceux-ci ne peut être considéré comme étant le support du pouvoir vaccinant de la bactérie correspondante.

4.1.1. Antigène O.

Comme l'a déjà souligné CIRODDE (65), en 1963, l'absence de relation entre le pouvoir protecteur effectif des vaccins et leur aptitude à induire la synthèse d'agglutinines O chez l'homme ou chez l'animal est une constatation déjà ancienne. Elle a été confirmée plus récemment à l'occasion de campagnes de vaccination de masse effectuées par BENENSON (23) et d'essais sur volontaires pratiqués par HORNICK (128) et GILMAN (111). Mais ce sont les expériences effectuées sur la souris à l'aide de **S. typhimurium** et **S. enteritidis** qui montrent le mieux l'incapacité des anticorps anti-O à protéger l'animal contre une dose d'épreuve de bactéries pathogènes (130, 136, 144, 145, 238).

GAINES et coll. (106), ainsi que TULLY et coll. (247) ont d'autre part constaté que le lipopolysaccharide purifié ne vaccine pas le chimpanzé contre une fièvre typhoïde expérimentale.

4.1.2. Antigène Vi.

La plupart des études réalisées sur la souris à l'aide de **S. typhi** Ty 2 mettent en évidence un parallélisme entre le taux d'anticorps anti-Vi et la protection de l'animal contre une dose létale de cette bactérie, administrée par voie intrapéritonéale (238).

Comme le souligne BRUNOT (43), un tel système expérimental manque de rigueur dans la mesure où **S. typhi** n'est pas un agent pathogène naturel de la souris. D'autre part, le caractère Vi+ est tout à fait contingent chez les salmonelles et son absence n'implique pas nécessairement l'absence de virulence de la souche. On ne voit donc pas comment l'antigène Vi vaccinerait efficacement contre une bactérie pathogène dépourvue de cet antigène.

Effectivement, DIENA et coll. (84, 85, 86) ont échoué dans leur tentative de protéger la souris à l'aide de l'antigène Vi contre une dose d'épreuve contenant un hybride pathogène de **S. typhi** et **S. typhimurium.**

L'absence chez l'homme de corrélation entre le taux d'anticorps sériques anti-Vi et la résistance aux salmonelles a été démontrée également par BENENSON (23) et GILMAN (111). Il n'est donc pas étonnant que HORNICK et coll. (128) aient constaté que des volontaires vaccinés à l'aide de l'antigène Vi purifié n'étaient pas protégés contre un dose d'épreuve de **S. typhi** Quailes administrée per os.

4.1.3. Antigène H.

Pendant longtemps les opinions concernant le pouvoir immunisant de l'antigène H, ou antigène flagellaire, ont été tout à fait contradictoires. Ainsi, certains auteurs comme ARKWIGT (9) et RAFFEL (212) considèrent que l'antigène H n'intervient pas dans la vaccination. D'autres comme EDSALL (93), WAHDAN (261), BENENSON (23) et KHEIFETS (148), affirment au contraire que l'efficacité des vaccins est proportionnelle à la quantité d'antigène flagellaire présente dans ces derniers.

Ces divergences viennent probablement du fait qu'il s'agit de conclusions établies à partir d'essais réalisés sur le terrain, car les études effectuées sur l'animal n'ont pas donné de résultats favorables. Si CAREY et BARON (47) constatent que l'antigène H purifié protège la souris

contre une dose d'épreuve de **S. typhi** Ty 2, injectée par voie intrapéritonéale, on peut souligner que leur système expérimental est tout à fait discutable. D'ailleurs l'immunité qu'ils observent ne paraît pas spécifique, puisqu'un antigène chauffé essayé en parallèle se montre aussi efficace.

Les expériences de TULLY et coll. (245, 246) nous paraissent plus probantes. Ayant vacciné des chimpanzés à l'aide de souches mobiles ou immobiles de **S. typhi** et les ayant ensuite éprouvés à l'aide des mêmes souches mobiles, ces auteurs constatent que la protection obtenue est comparable pour les deux vaccins, ce qui les autorise à conclure que l'antigène H ne joue aucun rôle dans la vaccination.

On ne dispose pas de résultats concernant la vaccination de sujets volontaires à l'aide de l'antigène H purifié. Toutefois, GILMAN et coll. (111) notent que chez des sujets efficacement vaccinés à l'aide d'un mutant R de **S. typhi,** administré par voie buccale, il n'y a aucun parallélisme entre la protection et le taux des anticorps anti-H.

4.1.4. L'antigène commun des entérobactéries (ECA).

Il paraît difficile d'attribuer à cet antigène un rôle important dans le problème qui nous intéresse, du moment qu'il s'agit d'un constituant commun à plusieurs espèces d'entérobactéries, et qu'il est admis que la vaccination contre les salmonelles est spécifique de l'espèce bactérienne pénétrant dans l'organisme.

Les seuls essais concluants ont été réalisés par GORZINSKY et coll. (113, 114). Il en ressort que l'injection à des souris d'un ECA extrait de **E. coli** a pour effet de prolonger de manière significative la durée de survie des animaux éprouvés à l'aide de **S. typhimurium,** sans augmenter le nombre de survivants par rapport aux témoins non vaccinés.

4.2. Vers la découverte de l'«antigène protecteur».

4.2.1. Efficacité des vaccins ribosomaux.

YOUMANS (268) ayant montré, en 1965, que les ribosomes des mycobactéries associés à l'adjuvant incomplet de Freund sont aussi efficaces que les vaccins vivants pour protéger la souris contre les bactéries pathogènes homologues, de nombreuses équipes se sont intéressées depuis aux «vaccins ribosomaux». La plupart des vaccins utilisés, provenant aussi bien de bactéries à Gram positif que de bactéries à Gram négatif, se sont révélés efficaces comme en témoignent les analyses des résultats effectuées par ROBERT (219), BRUNOT (43) et DUSSOURD D'HINTERLAND (92).

Des préparations ribosomales provenant de salmonelles pathogènes pour les rongeurs, telles que **S. typhimurium** (VENNEMAN : 251, 253, 255, 256 ; JOHNSON : 140, 141 ; HOUCHENS : 129 ; EISENSTEIN : 94 ; HOOPS : 125 ; SMITH : 234, 235 ; MOLINARI : 186) et **S. enteritidis** (EISENSTEIN : 94 ; MARGOLIS : 175) mais aussi d'autres salmonelles telles que **S. typhi** (MOLINARI : 184, 185) ont été utilisées pour vacciner la souris. Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent que la protection conférée par ces vaccins est comparable à celle des vaccins vivants sans que l'adjonction d'adjuvant soit nécessaire.

4.2.2. Nature du facteur immunisant.

Si la plupart des auteurs admettent l'efficacité des préparations ribosomales provenant des salmonelles, il n'existe pour l'instant aucune certitude concernant la nature chimique du facteur immunisant.

Pour JOHNSON (140, 141), il ne peut s'agir que d'une protéine puisque les préparations efficaces perdent leur pouvoir vaccinant après action de la trypsine ou de la pronase, alors qu'elles ne sont pas moins actives après un traitement par la ribonucléase. VENNEMAN et BERRY (26, 251, 252, 253, 254) pensent qu'il s'agit d'un acide ribonucléique peu sensible, du fait de sa structure particulière, à l'action de la ribonucléase. Mais ils n'excluent pas l'intervention d'un contaminant qui devrait être alors un polysaccharide de poids moléculaire élevé pour lequel l'acide nucléique servirait d'adjuvant.

SMITH et BIGLEY (232, 234, 235) attribuent le pouvoir immunisant à un complexe RNA-protéine, tandis que HOUCHENS (129) penche pour l'existence d'un antigène qui serait soit une glycoprotéine, soit un mucopolysaccharide de poids moléculaire élevé.

Ayant étudié plusieurs vaccins ribosomaux provenant de mutants de salmonelles, EISENSTEIN (94) constate que ces vaccins sont contaminés par du lipopolysaccharide et conclue que le pouvoir protecteur spécifique observé est lié, au moins partiellement, à la présence de l'antigène O. Ceci nous paraît peu vraisemblable, compte tenu de ce que nous avons dit de l'antigène somatique. D'ailleurs, si HOOPS et coll. (125), dans une étude plus récente, ont retrouvé du lipopolysaccharide dans les fractions actives provenant d'un vaccin ribosomal extrait de **S. typhimurium,** ces auteurs se gardent bien d'attribuer le pouvoir immunisant à l'antigène O et préfèrent conclure que la nature du constituant actif reste encore à définir.

LIN et BERRY (167) pensent que l'effet protecteur des ribosomes est lié à la contamination des préparations ribosomales par des protéines provenant de l'enveloppe cellulaire, mais n'excluent pas une intervention possible d'autres contaminants. L'existence, dans les préparations ribosomales efficaces, de protéines identiques à celles que l'on peut extraire de l'enveloppe externe des bactéries à l'aide de détergents a été confirmée récemment par MISFELD et JOHNSON (181), ce qui amène ces auteurs à conclure que l'efficacité des vaccins ribosomaux dépend de la présence de ces protéines superficielles. Aucune molécule active n'a cependant été caractérisée.

4.2.3. La voie de l'antigène soluble.

Quelques équipes ont adopté une voie différente de celles des ribosomes, en orientant leurs recherches vers la mise en évidence d'un antigène protecteur soluble facilement extractible de la bactérie à l'aide de solutions salines, ou pouvant être retrouvé dans le surnageant de culture de cette dernière.

4.2.3.1. Extraction à partir des bactéries.

Ainsi, AUZINS et ROWLEY (13) en 1963, puis JENKIN et ROWLEY (139) en 1965, utilisant une solution de dodécylsulfate de sodium, ont extrait de **S. typhimurium** et d'autres salmonelles un antigène thermosoluble, de nature non précisée, pouvant stimuler la vitesse de phagocytose des macrophages péritonéaux de souris, **in vitro.** Toutefois, la préparation obtenue par COLLINS et MILNE (70, 71) en appliquant la même technique d'extraction aux parois ectoplasmiques de **S. enteritidis,** préalablement isolées, s'est révélée incapable d'inhiber la multiplication de la bactérie pathogène correspondante **in vivo,** chez la souris.

L'usage d'une solution alcaline de pH 11 a permis à KAWAKAMI (144) d'isoler à partir de **S. enteritidis** un antigène vaccinant que l'auteur a ensuite purifié par précipitation à l'aide du sulfate d'ammonium et chromatographié sur DEAE-Sephadex. Le produit obtenu, défini comme étant une toxine thermolabile de nature phospholipoprotéique, présentait un pouvoir immunisant significatif, mais nettement inférieur à celui du vaccin vivant correspondant.

En soumettant les bactéries préalablement séchées par l'acétone à une simple extraction par l'eau, SEVERTSOVA et STANIAVSKI (231) ont en 1977 isolé à partir de **S. typhimurium** un complexe antigénique qu'ils ont ensuite fractionné par ultrafiltration et par chromatographie

d'exclusion. Etudiant comparativement l'effet protecteur des différentes fractions vis-à-vis d'une dose létale de bactéries pathogènes administrée par voie buccale, ces auteurs constatent que l'activité protectrice se répartit entre les constituants de poids moléculaire élevé ($> 2 \times 10^6$) et ceux de poids moléculaire relativement faible (< 20.000). Ils ne précisent pas la nature chimique des fractions actives.

On ne connaît pas davantage la composition de l'«antigène X» que JOYEUX et coll. (142, 143) ont extrait de l'enveloppe externe de **S. typhi** en utilisant une solution 0,5 M de NaCl. Cet antigène, injecté au lapin, induit chez ce dernier la synthèse d'anticorps capables de protéger l'embryon de poulet contre la bactérie pathogène correspondante.

4.2.3.2. Extraction à partir des surnageants de culture.

Tenant compte des résultats favorables que certains d'entre eux avaient déjà obtenus dans le cas de **Yersinia pestis** (77, 104), IVANOFF, CREACH, FONTANGES et coll. ont cherché à mettre en évidence l'existence d'un antigène protecteur dans le surnageant de culture d'un mutant avirulent de **S. typhimurium,** la souche M-206. Ils ont montré, en 1974, que ce surnageant contenait un facteur qui, administré à la souris par voie buccale, était aussi efficace que le vaccin vivant correspondant pour la protection de l'animal contre une dose d'épreuve de bactéries pathogènes donnée par la même voie (76, 131, 132). Au cours de l'isolement et de la purification du constituant actif, ils ont constaté que le pouvoir immunisant appartenait à plusieurs fractions se distinguant les unes des autres à la fois par leur taille et leur charge électrique (43, 74, 76, 131, 132). L'étude des antigènes présentant un caractère macromoléculaire a permis de montrer que l'activité de ces derniers était due à la présence de chaînes glycoprotéiques de poids moléculaire relativement faible (43, 74). Nous reviendrons de manière plus détaillée sur ces travaux qui ont servi de point de départ à nos recherches personnelles.

Plus récemment, PLANT et coll. (200) ont retrouvé un facteur immunisant dans le surnageant de culture d'une souche pathogène de **S. typhimurium,** la souche C 5. La nature de ce facteur n'est pas précisée, mais elle serait, d'après les auteurs, partiellement protéique. Injecté aux souris par voie intrapéritonéale, cet antigène protège les animaux contre une dose d'épreuve de bactéries vivantes correspondantes, mais ne leur permet pas de survivre à une dose létale de **S. enteritidis.** Il est intéressant de souligner également que ce facteur provoque des réactions d'hypersensibilité retardée chez les souris préalablement sensibilisées par des doses non létales de salmonelles.

5. Conclusion.

Il apparaît à travers l'étude des résultats obtenus en utilisant les vaccins injectables classiques que ces derniers n'assurent à l'individu qu'une protection tout à fait relative vis-à-vis des salmonelles pathogènes.

Les vaccins buccaux, et plus particulièrement ceux qui contiennent des bactéries vivantes, se révèlent nettement plus efficaces, mais leur utilisation pose encore un certain nombre de problèmes d'ordre pratique ou psychologique.

Le fait qu'il soit possible d'extraire des salmonelles ou de leur surnageant de culture des antigènes capables de vacciner efficacement les animaux par voie buccale ouvre des perspectives particulièrement intéressantes tant pour la prévention des fièvres typho-paratyphoïdiques que pour celle des salmonelloses.

2ème PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

Cherchant à vérifier la valeur des vaccins buccaux pour la prévention des salmonelloses, IVANOFF, CREACH, FONTANGES et coll. (103, 133, 135) avaient constaté qu'un mutant avirulent de **S. typhimurium,** la souche M-206, introduit par la voie orale sous forme de vaccin vivant, protégeait la souris contre une dose létale de la bactérie pathogène homologue, alors que cette dernière, utilisée sous forme de vaccin inactivé, ne conférait à l'animal qu'une très faible immunité.

Adoptant une technique qui s'était déjà révélée intéressante pour l'isolement de l'antigène vaccinant de **Yersinia pestis** (77, 104), ils ont utilisé le surnageant de culture de la bactérie, plutôt que la bactérie elle-même, pour l'extraction du facteur immunisant. Ils ont ainsi obtenu une préparation brute qui vaccinait la souris par voie buccale aussi efficacement que le vaccin vivant correspondant.

Les premiers essais de purification de l'antigène vaccinant ont montré que plusieurs structures moléculaires, se distinguant par leur taille et leur charge électrique, présentaient la même activité (76, 131). Ils ont fait apparaître d'autre part que la distribution de ces dernières variait considérablement en fonction du protocole expérimental utilisé (figure n° 1). Si l'on faisait appel à l'ultrafiltration directe, la majorité des constituants se retrouvait en effet dans la fraction des constituants de poids moléculaire supérieur à 3×10^5 (fraction ⑥), tandis que si l'on faisait précéder l'ultrafiltration d'une précipitation par le sulfate d'ammonium, les structures recueillies avaient presque toutes des poids moléculaires inférieurs à 3×10^5 (fraction ⑤).

L'étude de la fraction ⑥ effectuée par CREACH, BRUNOT et coll. (43, 74) a permis de constater que celle-ci était très hétérogène, plusieurs de ses constituants étant capables de protéger la souris. Il est apparu cependant que cette propriété était liée à la présence d'une même sous-unité de nature vraisemblablement glycoprotéique.

Sachant que celle-ci présentait un poids moléculaire apparent relativement faible, nous avons pensé qu'elle pourrait se trouver à l'état libre dans la fraction ⑤, obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium. Notre exposé sera consacré à la vérification de cette hypothèse. Nos premiers résultats ont déjà fait l'objet d'un rapport (75).

Dans le premier chapitre, nous décrirons le matériel et les techniques utilisées. Nous exposerons, dans le second, nos résultats expérimentaux. Nous terminerons par une discussion générale de ces derniers, en précisant les possibilités offertes par ce type d'antigène utilisable par la voie buccale.

CHAPITRE 1

MATERIELS ET METHODES

1. Préparation de l'antigène brut.

1.1. La souche avirulente.

Comme souche avirulente de **S. typhimurium,** nous avons utilisé la souche M-206 provenant de l'Institut Pasteur de Paris. Il s'agit d'un mutant dont la teneur en antigène O est faible, bien que cet antigène soit complet. Cette bactérie a été décrite pour la première fois par ARCHER et ROWLEY en 1969 (7). Les cultures en tubes à essais ont été effectuées à 34°C sur bouillon «Eugonbroth».

1.2. Culture des bactéries.

Des essais préliminaires ayant montré l'importance de l'inoculum pour obtenir un rendement convenable en bactéries, nous avons d'abord ensemencé 10 ml de milieu «Eugonbroth» qui, après 24 heures d'incubation à 34°C, ont été transférés dans un ballon contenant 250 ml du même milieu. Cette seconde culture a servi ensuite à ensemencer 1250 ml du bouillon qui, après une incubation dans les mêmes conditions, ont été transférés dans un petit fermenteur CHEMAP contenant 13,5 l du même milieu.

Après 24 heures de culture, le contenu de ce petit fermenteur a servi à ensemencer un grand fermenteur CHEMAP de 135 litres d'une solution aqueuse contenant 1,5 p. 100 d'hydrolysat de caséine, 0,5 p. 100 de peptone pancréatique, 0,4 p. 100 de NaCl, 0,1 p. 100 de citrate de sodium, 0,02 p. 100 de cystine, 0,02 p. 100 de sulfite de sodium et 0,5 p. 100 de glucose. Le pH de cette solution a été, au départ, ajusté à 7,7. La température de la culture était de 34°C, l'oxygénation de 15 l d'air/mn et l'agitation de 1200 t/mn.

Au bout de 18 heures, le contenu du fermenteur a été centrifugé à 16000 t/mn sur centrifugeuse SHARPLES 16 RR, ce qui a permis de recueillir 980 g de culot bactérien humide et un surnageant de culture qui a servi à la préparation du vaccin.

1.3. Extraction des antigènes (figure n° 1).

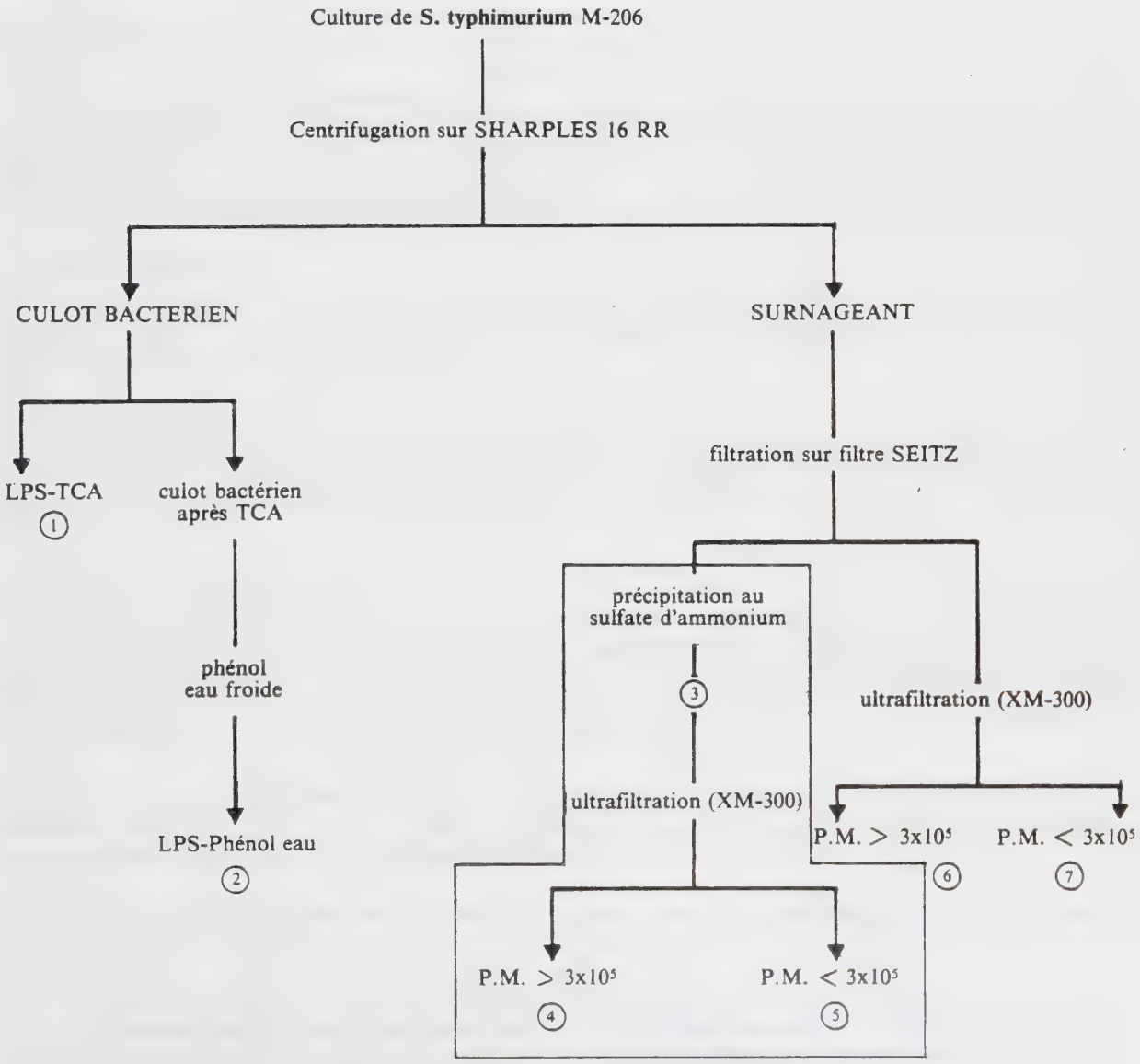
Ce surnageant (130 l) a été filtré sur filtre-presse SEITZ équipé de cinq plaques clarifiantes KoTh 7 et de cinq plaques filtrantes EKS. Le filtrat obtenu a été saturé en sulfate d'ammonium. Après un séjour de 12 heures à + 2°C, l'insoluble apparu à la surface a été recueilli, redissous dans de l'eau, dialysé contre l'eau du robinet pendant 24 heures puis contre de l'eau distillée pendant 48 heures et enfin lyophilisé.

Nous avons obtenu 216 grammes de produit correspondant à la fraction ③. Après remise en solution dans de l'eau distillée à raison de 10 mg/ml, les constituants de poids moléculaire supérieur à 3 x 10^5 daltons et ceux de poids moléculaire inférieur à 3 x 10^5 daltons ont été séparés par ultrafiltration (50 ml/h) sur membranes AMICON XM-300 montées sur une cellule standard AMICON-402.

La fraction correspondant aux poids moléculaires supérieurs à 3x10^5 (fraction ④) représentait 9 p. 100 des constituants de la fraction ③. Elle était insoluble dans l'eau. La spectrographie infrarouge a montré qu'elle contenait essentiellement des silicones provenant de la suspension antimousse ajoutée au milieu de culture.

La fraction ⑤, correspondant aux poids moléculaires inférieurs à 3 x 10^5, représentait 91 p. 100 de la fraction ③.

Figure n° 1 : préparation des diverses fractions de culture de **S. typhimurium** M-206.



2. Purification de l'antigène.

2.1. Chromatographie d'exclusion (215).

2.1.1. Principe.

La chromatographie d'exclusion moléculaire sur colonne de gel a été introduite par PORATH et FLODIN en 1959 (202). Elle permet de séparer les constituants d'un mélange en fonction de leurs poids moléculaires. La séparation est obtenue par percolation d'une prise d'essai à travers une colonne de particules poreuses formant un gel non ionisé.

Lors du dépôt d'un échantillon constitué d'un mélange de molécules de tailles différentes et élué par un solvant, les molécules trop volumineuses ne peuvent pas pénétrer dans la structure poreuse du gel et traversent rapidement la colonne dans la phase extérieure aux mailles du réseau. Les petites molécules, au contraire, pénètrent dans la matrice du gel. Elles vont donc être retardées dans leur migration. Les molécules sont éluées dans l'ordre décroissant de leur poids moléculaire.

Ainsi, on définit le domaine de séparation du gel comme étant l'échelle de poids moléculaire pour laquelle on obtient une séparation. Sa limite supérieure correspond à la limite d'exclusion et sa limite inférieure est un peu arbitraire.

2.1.2. Gels utilisés.

2.1.2.1. Gels de dextranes (Sephadex).

Ils sont obtenus en traitant des dextranes linéaires de longueur variable par l'épichlorhydrine. Ce sont des xérogels dont le domaine de séparation varie, suivant le type du gel, de 100 à 800.000 daltons pour les protéines globulaires. Les colonnes obtenues se tassent facilement. De plus, ces gels peuvent être dégradés par les dextranases d'origine bactérienne.

— **Le Sephadex G-25 :**

Il permet le fractionnement de molécules dont les P.M. apparents sont compris entre 100 et 5000 daltons. Nous l'avons utilisé pour le dessalage des fractions séparées par isoélectrofocalisation sur gradient de saccharose.

— **Le Sephadex G-75 :**

Il permet la séparation des molécules dont les P.M. apparents sont compris entre 1000 et 50000 daltons. Nous l'utilisons maintenant pour le dessalage de la fraction B obtenue par isoélectrofocalisation. Cette méthode doit aussi nous permettre de confirmer le P.M. de cette même fraction.

2.1.2.2. Gels mixtes (Ultrogel*)

URIEL (235, 248) a montré, en 1971, que les gels constitués d'une matrice mixte de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, possédaient des propriétés chromatographiques supérieures à celles des autres milieux utilisés en chromatographie d'exclusion. Ces gels commercialisés sous le nom d'Ultrogel* permettent le fractionnement des molécules de poids moléculaires compris entre 1000 et 1200000 daltons.

Il existe plusieurs types d'Ultrogel* désignés par l'abréviation AcA (pour acrylamide et agarose) suivie de deux chiffres, le premier indiquant le pourcentage d'acrylamide contenu dans la suspension, le second, le pourcentage d'agarose.

C'est ce type de gel que nous avons utilisé pour séparer les constituants de nos fractions en fonction de leur taille.

— Pour la fraction ④, de P.M. supérieur à 300000 daltons, nous avons utilisé :

- **l'Ultrogel AcA 22 :** ce gel est constitué de 2 p. 100 d'acrylamide et de 2 p. 100 d'agarose, le diamètre des perles est compris entre 60 et 140 μm. La gamme de fractionnement s'étend de

100000 à 1200000 daltons, avec une limite d'exclusion à 3000000 daltons.

— Pour la fraction ⑤, de P.M. inférieur à 300000 daltons, nous avons utilisé successivement et dans l'ordre :

- **l'Utrogel AcA 34** : il s'agit d'un gel contenant 3 p. 100 d'acrylamide et 4 p. 100 d'agarose, le diamètre des perles étant compris entre 60 et 140 μm et la gamme de fractionnement entre 20000 et 350000 daltons, avec une limite d'exclusion se situant à 750000 daltons.
- **l'Ultrogel AcA 54** : il contient 5 p. 100 d'acrylamide et 4 p. 100 d'agarose, le diamètre des perles étant compris entre 60 et 140 μm et la gamme de fractionnement entre 5000 et 70000 daltons, avec une limite d'exclusion de 90000 daltons.
- **l'Ultrogel AcA 202** : ce gel est caractérisé par une teneur en acrylamide de 20 p. 100 pour une teneur en agarose de 2 p. 100, ce qui lui confère une très grande résolution (plus de 3000 plateaux théoriques/mètre) ; le diamètre des perles est compris entre 60 et 140 μm, la gamme de fractionnement entre 1000 et 15000 daltons, avec une limite d'exclusion de 22000 daltons.

Tous ces gels sont stables entre les pH 3 et 10, et utilisables entre 2 et 36°C. Leur très faible tendance au tassement permet des débits de filtration élevés, même après des usages répétés.

2.1.3. Détermination du P.M. et notion de Kav.

A l'intérieur de la gamme de fractionnement effectif de chaque gel, le volume d'élution Ve d'une protéine déterminée est une fonction linéaire du logarithme de son poids moléculaire. Travaillant à débit constant avec une colonne dont le volume total Vt ne varie pas, il est donc possible de déterminer le poids moléculaire d'une protéine, en se reportant à une courbe d'étalonnage établie à l'aide de protéines de P.M. connus, les volumes d'élution étant en ordonnée et les logarithmes des P.M. en abscisse.

On peut, d'autre part, établir pour chaque protéine un coefficient de partage caractéristique, ou Kav, donné par la relation suivante :

$$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

où

- Vo représente le volume de la phase liquide située entre les particules du gel, et mesuré par le volume d'élution d'une substance totalement exclue du gel.
- Ve est le volume d'élution d'une protéine de poids moléculaire donné, correspondant au maximum du pic inscrit sur le diagramme d'élution.
- Vt correspond au volume total occupé par le gel dans la colonne.

Le Kav est nul pour une molécule totalement exclue du gel : c'est le cas du Bleu Dextran 2000 avec les gels que nous avons utilisés. Il tend vers 1 pour les petites molécules comme le NaCl.

Le Kav, comme le volume d'élution, varie linéairement en fonction du logarithme du poids moléculaire, mais il est indépendant des dimensions de la colonne utilisée et du débit de celle-ci.

2.1.4. Protocole expérimental.

Nous avons opéré dans les mêmes conditions pour les différents types de gel.

2.1.4.1. Préparation du gel.

— Les xérogels (Sephadex) sont mis à gonfler en solution aqueuse, de telle sorte que, après sédimentation, le volume en excès soit environ 10 fois celui du gel gonflé.

— Dans une éprouvette de 1 l, on introduit 500 ml d'Ultrogel, prêt à l'emploi, et on le lave 2 fois par décantation, à l'aide de 500 ml de Tampon phosphate pH 7,2-0,066 M, pour éliminer

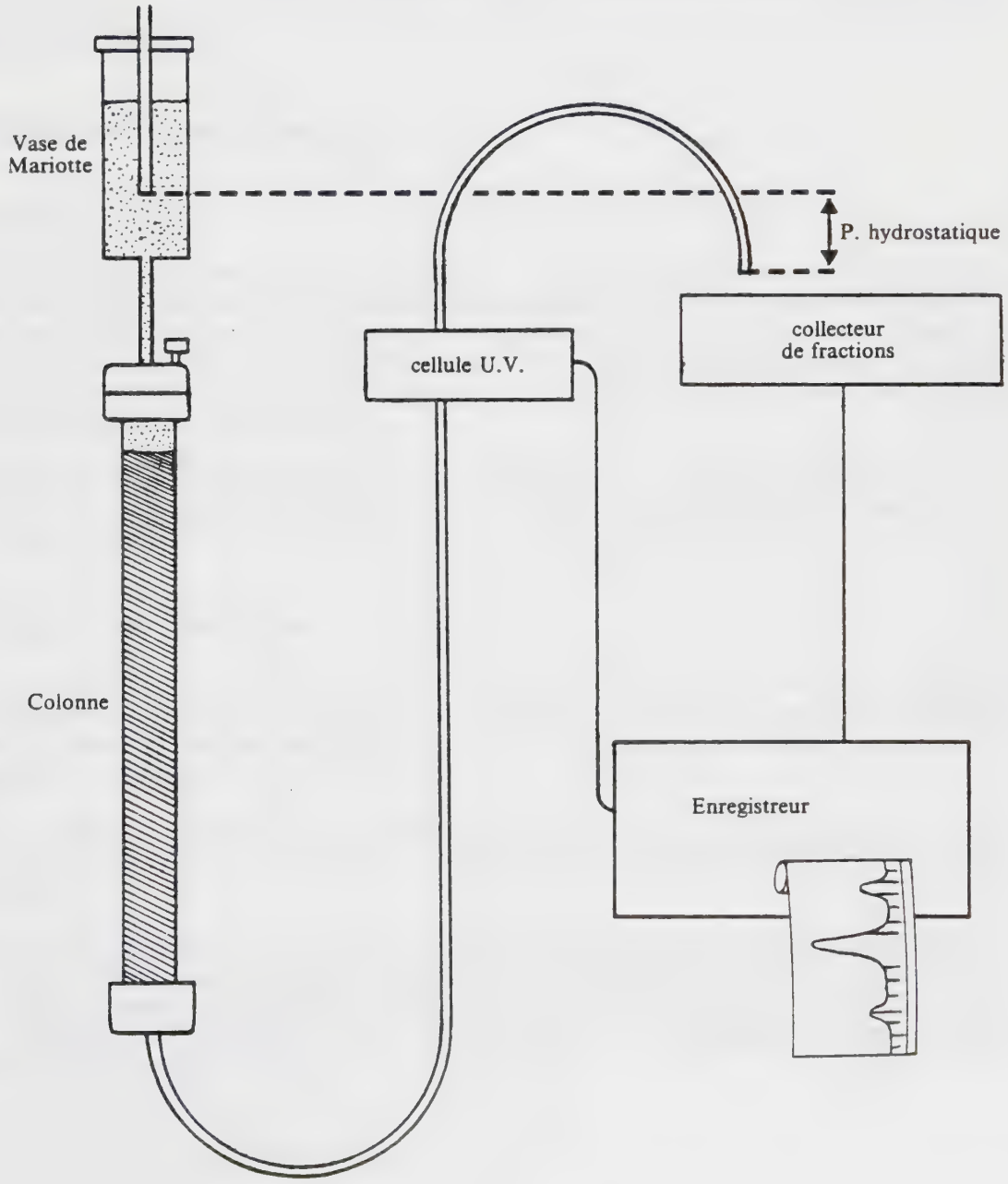
l'azide de sodium. On le remet en suspension dans 500 ml du même tampon et, après l'avoir transvasé dans un bécher de 2 litres, on le dégaze sous le vide d'une trompe à eau pendant une nuit, à température du laboratoire.

2.1.4.2. Remplissage des colonnes.

Nous avons utilisé des colonnes en verre borosilicaté de 2,5 cm de diamètre et de 1 m de haut (colonnes K 25/100 Pharmacia) placées dans une armoire réfrigérée (Enceinte mini RE/2 Gilson).

La colonne munie de son réservoir de remplissage est remplie de tampon jusqu'aux deux tiers de la hauteur. Après avoir chassé l'air de la tubulure de sortie et réglé la hauteur de cette dernière pour éviter toute surpression, nous avons introduit dans la colonne environ 450 ml de gel, afin que la hauteur de ce dernier, après sédimentation, soit voisine de 90 cm. Nous avons ensuite stabilisé le gel en y faisant passer 1 litre de tampon à partir d'un vase de Mariotte fixé à une hauteur telle que la pression hydrostatique soit égale à 20 cm d'eau.

Figure n° 2 : Montage expérimental.



2.1.4.3. Dépôt des échantillons.

Le volume de l'échantillon doit être compris entre 0,5 et 4 p. 100 du volume total du gel : plus il est faible, meilleure est la résolution. Nous avons donc pris des échantillons de 100 mg de produit lyophilisé dissous dans 5 ml de tampon phosphate. Cette solution était centrifugée à 10000 g pendant 15 minutes pour éliminer les particules insolubles, puis déposée au sommet du gel à l'aide d'un applicateur.

2.1.4.4. Elution (figure n° 2).

L'élution a été réalisée par gravité, sous pression constante réglée à l'aide d'un vase de Mariotte. Le débit était de 6 ml/heure, en moyenne, pour une pression hydrostatique de 20 cm.

Le dosage des solutés présents dans l'éluat a été effectué à l'aide d'un absorptiomètre ISCO UA-5 équipé d'un filtre de 254 nm. Nous justifierons plus loin le choix de cette longueur d'onde.

Des fractions de 100 gouttes, soit 5 ml environ, ont été recueillies à l'aide d'un collecteur Microcol Gilson, ce qui a permis d'effectuer un dosage spectro-photomètrique des constituants organiques à 230 ou 210 nm (Spectrophotomètre Varian 623 S) et un dosage des protéines par la méthode de LOWRY.

2.2. Chromatographie par échange d'ions (198).

2.2.1. Principe.

Les protéines sont des substances amphotères qui, en solution, possèdent à la fois des groupes ionisés, positifs et négatifs, et dont la charge nette dépend du pH du solvant. Aux pH acides, leur charge nette est positive et elles se fixent sur les échangeurs de cations, tandis qu'aux pH basiques, leur charge nette est négative et elles se fixent sur les échangeurs d'anions. Pour une valeur particulière du pH (pHi ou pH isoélectrique), ces substances ont une charge nette nulle, et elles ne se fixent sur aucun échangeur d'ions.

Lorsqu'une protéine est fixée sur une colonne d'échangeur d'ions, on peut l'éluer soit en faisant varier le pH du solvant en direction du pHi, soit en augmentant la force ionique de la solution tampon utilisée, ce qui est plus aisé.

2.2.2. Principaux échangeurs d'ions.

Pour la séparation des petites molécules ionisées, on peut utiliser soit des échangeurs d'ions minéraux (aluminosilicates, phosphate de zirconium), soit des résines échangeuses d'ions dont la matrice, obtenue par copolymérisation du styrène et du divinyl-benzène, porte des groupements anioniques ou cationiques.

Ces échangeurs se prêtent mal à la séparation des protéines car leur réticulation est trop fine et les grosses molécules ne peuvent pas accéder aux groupements ionisés situés à l'intérieur des particules.

Pour séparer ces molécules, on utilise donc de préférence des échangeurs d'ions à matrice polysaccharidique (cellulose ou agarose), dont la taille des pores est nettement plus élevée. Il est en effet facile de greffer sur ces matrices soit des groupements échangeurs d'anions, comme les radicaux diéthylaminoéthyles (DEAE), soit des groupements échangeurs de cations, comme les radicaux carboxyméthyles.

2.2.3. Protocole expérimental.

2.2.3.1. Choix de l'échangeur.

Nous avons utilisé un gel de DEAE-Sepharose CL-6B (Produit Pharmacia N° 77101). Il possède une matrice d'agarose (Sepharose) réticulée par action du 2,3-dibromopropanol et désulfatée par hydrolyse alcaline en milieu réducteur. Ce gel est caractérisé par une grande capacité, une bonne vitesse d'écoulement et un pouvoir de résolution élevé. Il est stable entre les pH 3 et 10, sans subir de variations de volume. De plus, il est livré prêt à l'emploi et ne nécessite donc pas de gonflement préalable.

Nous l'avons simplement équilibré à l'aide du tampon utilisé pour la chromatographie. Pour cela, 20 ml de gel ont été lavés par décantation trois fois dans 100 ml de tampon acétate pH 5,6-0,05 M, puis trois fois dans 100 ml de tampon identique mais 0,025 M, et enfin dégazés sous vide.

2.2.3.2. Préparation de la colonne.

Dans une colonne de 9 mm de diamètre et 15 cm de haut (colonne K 9/15 Pharmacia), nous avons introduit 10 ml de gel, de telle manière que la hauteur de ce gel après stabilisation soit voisine de 10 cm.

Sur ce gel nous avons fait passer 100 ml de tampon acétate pH 5,6-0,05 M, jusqu'à ce que l'éluat présente exactement le même pH et la même conductivité qu'à l'entrée.

2.2.3.3. Chargement et élution.

Nous avons déposé au sommet du gel 20 mg de fraction ⑤ dissous dans 2 ml de tampon acétate pH 5,6-0,025 M.

L'élution a été effectuée en faisant passer successivement sur la colonne :
75 ml de tampon acétate pH 5,6-0,025 M
75 ml de tampon acétate pH 5 -0,025 M
75 ml de tampon acétate pH 4,5-0,025 M
75 ml de tampon acétate pH 4 -0,025 M
150 ml de tampon acétate pH 4 -0,025 M, ce dernier tampon, additionné de chlorure de sodium, avec un gradient de concentration variant linéairement de 0,025 à 0,25 M.

Le volume des fractions recueillies était de 5 ml. Les constituants présents dans l'éluat ont été dosés par spectrophotométrie à 254 et 230 nm. Parallèlement les taux de protéines ont été dosés par la méthode de LOWRY.

2.3. Chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite.

2.3.1. Principe.

L'utilisation de gels de phosphate de calcium pour la séparation chromatographique des protéines a été décrite par TISELIUS à partir de 1951 (240, 242).

Deux variétés de gels peuvent être utilisées, soit la brushite, $CaHPO_4$, $2H_2O$, obtenue en mélangeant progressivement des solutions 0,5 M de $CaCl_2$ et de Na_2HPO_4, soit l'hydroxylapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ obtenue en chauffant la brushite dans une solution diluée de soude.

Ces gels, dont le pouvoir de résolution est très élevé, n'ont connu une large utilisation qu'à partir du moment où leur préparation a été parfaitement codifiée (25). Plusieurs firmes telles que Bio-Rad et IBF commercialisent actuellement des gels d'hydroxylapatite.

2.3.2. Protocole expérimental.

2.3.2.1. Choix du gel.

Comme gel d'hydroxylapatite, nous avons utilisé le Bio-Gel HTP de Bio-Rad qui possède une excellente résolution et permet un débit rapide et uniforme. Nous avons pesé 6 g de Bio-Gel HTP sec que nous avons mis en suspension dans 50 ml de tampon phosphate pH 6,5-5 mM. Le gel obtenu a été lavé quatre fois par décantation dans la même quantité de tampon, puis dégazé sous vide.

2.3.2.2. Préparation de la colonne.

Nous avons introduit dans une colonne K 9/15 Pharmacia une quantité de gel telle que la hauteur après stabilisation soit égale à 12 cm. Celui-ci a été de nouveau lavé à l'aide de 150 ml de tampon et nous avons vérifié le pH et la conductivité à l'entrée et à la sortie de la colonne, comme précédemment.

2.3.2.3. Chargement et élution.

Un échantillon de 25 mg de fraction⑤ dissous dans 1 ml de tampon phosphate pH 6,5-5 mM a été déposé au sommet du gel. L'élution a été effectuée à l'aide de 10 tampons de même pH mais de molarité croissante, respectivement : 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 166 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM, 666 mM, à raison de 100 ml chaque fois.

L'éluat a été recueilli par fractions de 3,3 ml sur lesquelles nous avons contrôlé le pH, mesuré la densité optique à 254 et 230 nm, puis dosé les protéines par la méthode de LOWRY.

2.4. L'isoélectrofocalisation.

2.4.1. Sur gradient de saccharose (colonne).

2.4.1.1. Principe.

L'isolélectrofocalisation est un procédé de séparation des protéines selon leur pHi sur un gradient continu de pH réalisé par les ampholytes. Ces dernières sont des molécules polyamino-polycarboxyliques de pHi différents, mais très proches les uns des autres, dont l'ensemble réalise le gradient recherché.

En solution aqueuse à pH 7, les ampholytes sont ionisées selon leur pHi : elles migreront d'autant plus vers l'anode qu'elles auront un pHi correspondant à une augmentation de leur charge négative. Le gradient du pH s'établira de l'anode pour les pH les plus acides à la cathode pour les pH les plus basiques. Ce gradient de pH sera, en fait, un gradient de pHi. Lorsque le pH du gradient est égal au pHi de la molécule, celle-ci ne migre plus.

Un générateur créant une DDP entre anode et cathode permet de former et stabiliser le gradient de pH. Si l'on supprime ce champ électrique, les molécules d'ampholyte, neutralisées à leur pHi, redeviennent chargées : le gradient de pH n'existe plus et elles se mélangent. C'est pourquoi on utilise parallèlement un gradient de densité réalisé à l'aide de saccharose (ou d'éthylène-glycol) pour stabiliser et fixer le gradient de pH quand, à la fin de la manipulation, on coupe le courant pour récupérer les différentes fractions.

2.4.1.2. Matériel.

- colonne pour isoélectrofocalisation LKB 8100-1 (110 ml) composée d'un compartiment central [10] fermé par la valve [5] qui, en position ouverte permet la communication avec le compartiment externe [9] où a lieu l'électrofocalisation. Les parois de chacun de ces compartiments sont doubles et permettent une réfrigération à + 6°C (Thermostat HAAKE E-52)
- générateur de courant pour électrophorèse ISCO modèle 492
- pompe péristaltique GILSON Minipuls II
- collecteur de fraction GILSON Microcol TDC 80
- mélangeur pour gradients PHARMACIA GM 1
- absorptiomètre ISCO UA-5 avec unité optique type 6 équipée d'un filtre de 254 nm.

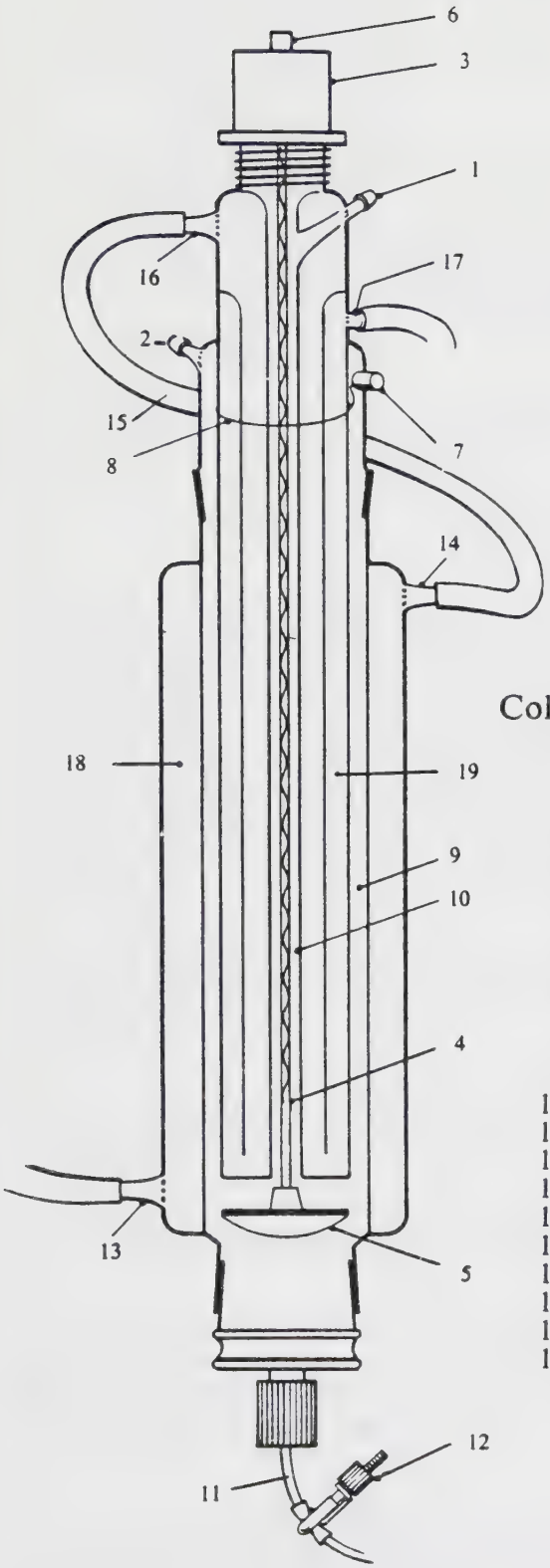


Figure n° 3
Colonne pour isoélectrofocalisation LKB 8100-1

1 embout permettant la communication avec le compartiment central.
2 embout permettant la communication avec le compartiment externe.
3 commande de la valve.
4 tige en teflon autour de laquelle est enroulé le fil cathodique.
5 valve.
6 cathode.
7 anode latérale.
8 fil anodique circulaire.
9 compartiment externe.
10 compartiment central.
11 sortie.
12 pince de MOHR.
13 entrée réfrigération externe.
14 sortie réfrigération externe.
15 connection réfrigération externe-centrale.
16 entrée réfrigération centrale.
17 sortie réfrigération centrale.
18 jaquette de réfrigération externe.
19 jaquette de réfrigération centrale.

2.4.1.3. Solutions utilisées.

— Solutions d'électrodes :

- à la cathode : solution dense basique à 60 p. 100 de saccharose (P/V)
  15 g de saccharose (produit MERCK n° 7651)
  10 ml d'eau distillée
  6 ml de NaOH 1M
- à l'anode : solution légère acide
  1,5 ml de H_3PO_4 1M
  8,5 ml d'eau distillée

— Solutions pour gradients de pH et de densité.

- solution dense à 50 p. 100 de saccharose (P/V)
  27 g de saccharose
  2 ml de solutions d'ampholytes à 40 p. 100 (P/V)
  soit Ampholine* LKB pH 3,5-10
  soit Pharmalyte* Pharmacia pH 3-10
  35 ml d'eau distillée

- solution légère à 5 p. 100 de saccharose (P/V)
  2,7 g de saccharose
  0,7 ml de solution d'ampholytes à 40 p. 100
  52,3 ml d'eau distillée, contenant l'échantillon à analyser, soit 100 mg de la fraction ⑤.

2.4.1.4. Protocole expérimental.

— Réalisation du gradient continu de pH et de densité.

- La valve [5] étant ouverte, et le tuyau de sortie [11] fermé par une pince de MOHR, on coule la solution dense basique par l'embout [1]. On arrête l'écoulement lorsque le niveau de la solution est à 2 cm au-dessus de la base du compartiment central.
- Le gradient est coulé dans le compartiment externe grâce au dispositif décrit dans la figure n° 4, jusqu'à 1 cm au-dessous de l'anode circulaire latérale [8].
- La solution légère acide est introduite à l'aide de la pompe péristaltique, par le même embout, jusqu'à 1 cm au-dessus de l'anode circulaire latérale.

— L'isoélectrofocalisation proprement dite s'effectue durant 48 heures, après avoir relié l'anode et la cathode à un générateur de courant continu délivrant une tension constante de 300 volts.

— On arrête alors le générateur et on ferme la valve [5], puis on procède à la récupération de la solution dense basique se trouvant dans le compartiment central (figure n° 5).

Un tuyau étant introduit par l'embout [2] est amené à 1 cm au-dessous de l'anode circulaire. On procède de la même façon pour récupérer la solution légère acide.

— Après avoir fait entrer de l'eau distillée jusqu'au sommet du compartiment externe, sans perturber la limite supérieure du gradient, on «pousse» celui-ci à l'aide d'une pompe péristaltique branchée sur l'embout [2]. La pince de MOHR étant ouverte, on récupère les fractions par la base de la colonne, selon la figure n° 6.

— On vérifie alors le profil du gradient de pH à l'aide d'un pH-mètre au 1/100e (Renaud électronique) et celui du gradient de saccharose à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE, à 20°C, puis on mesure la densité optique de chaque fraction à 230 nm (Spectrophotomètre UV-visible VARIAN series 634). Chacune de ces fractions est ensuite dialysée contre de l'eau distillée (3 fois 10 litres) pendant 48 heures pour éliminer le saccharose et les ampholytes, et finalement lyophilisée.

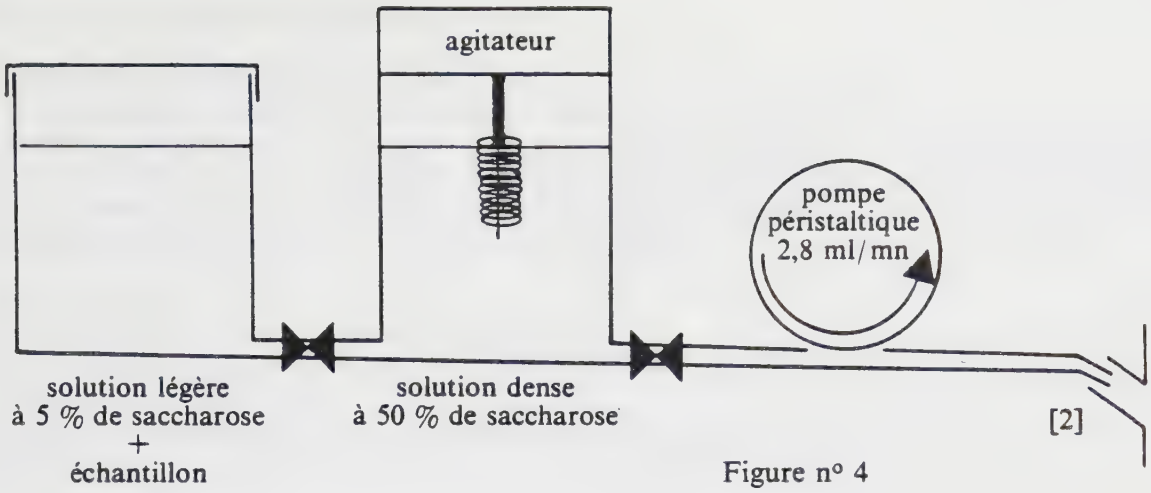


Figure n° 4

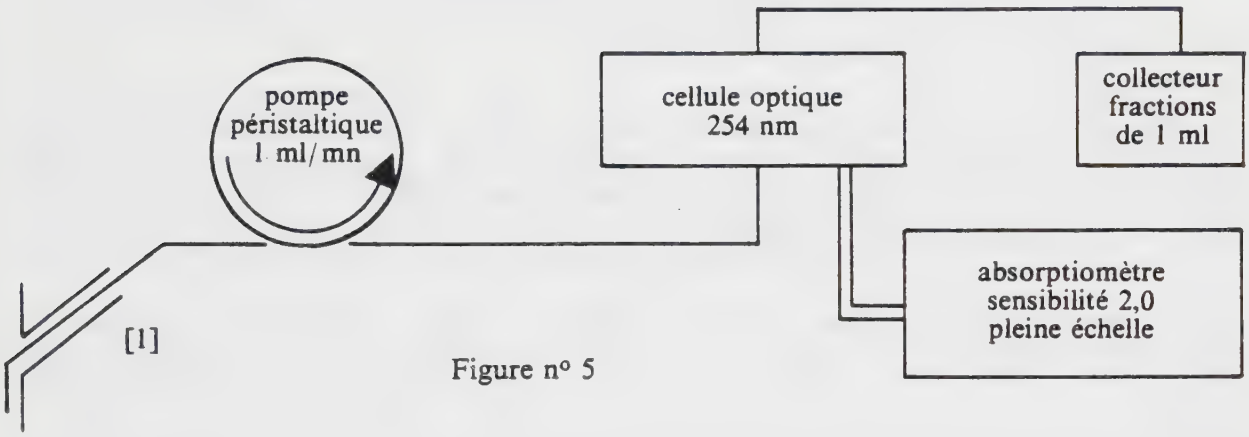


Figure n° 5

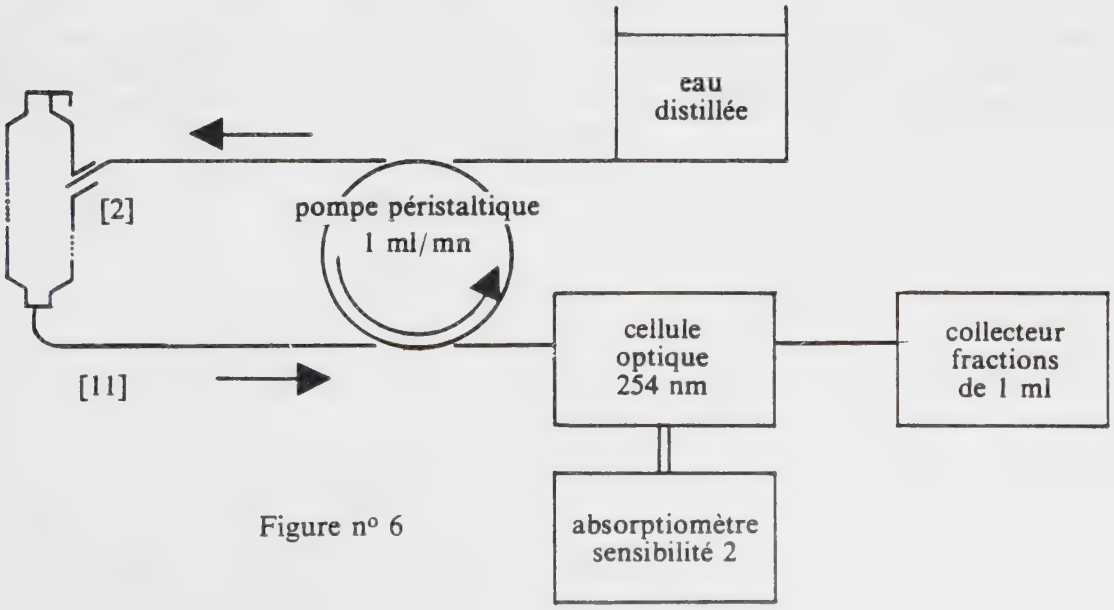


Figure n° 6

2.4.2. Sur gel granuleux (plaque).

2.4.2.1. Principe (204, 205, 206, 207, 208).

Le principe est le même que précédemment, mais ici, l'isoélectrofocalisation se fait horizontalement, sans gradient de saccharose, un gel granuleux (Sephadex IEF) tenant lieu de support et de stabilisateur pour le gradient de pH. Cette méthode permet de traiter des échantillons plus importants en moins de temps et en utilisant moins d'ampholytes. D'autre part, la dialyse se trouve simplifiée du fait de l'absence de saccharose.

2.4.2.2. Matériel.
- cuve Multiphor 2117 (LKB, Bromma, Suède)
- générateur de courant pour électrophorèse ISCO modèle 1420
- thermostat HAAKE E-52
- plateau de verre (24,2 x 10,8 cm) et grille de fractionnement LKB
- 30 microcolonnes d'élution en plastique LKB 2117-502 + laine de verre.

2.4.3.3. Réactifs utilisés.
- H_3PO_4 1 M ; NaOH 1 M ; TRITON X-100 0,1 p. 100 (solutions aqueuses).
- Sephadex G-75 pour isoélectrofocalisation (Sephadex IEF, Pharmacia).
- Solution d'Ampholine* à 40 p. 100, de pH 3,5-10 (Produit LKB n° 1809-101).
  - solution I : 0,5 ml d'Ampholine* + 9,5 ml d'eau distillée
  - solution II : 5 ml d'Ampholine* + 95 ml d'eau distillée.

2.4.2.4. Protocole expérimental.

— Pour réaliser le gel granuleux (266), on place aux deux extrémités du plateau, préalablement lavé et séché, trois bandes superposées de papier filtre (10,8 x 1,5 cm), imbibées de la solution I. On y verse alors 100 ml de solution aqueuse contenant 5 g de Sephadex IEF et 400 mg de fraction ⑤.

On pèse l'ensemble, puis à l'aide d'un séchoir soufflant, on fait évaporer 20 g d'eau à partir du gel, tout en évitant de perturber la surface de ce dernier.

— Au-dessus des bandes de papier filtre déjà en place et recouvertes de gel, on pose alors 10 bandes supplémentaires imprégnées soit de NaOH 1 M pour l'extrémité cathodique, soit de H_3PO_4 1 M pour l'extrémité anodique.

Le plateau ainsi recouvert est alors posé sur la plaque réfrégérante de la cuve MULTIPHOR, le contact étant assuré par un film de Triton X-100 en solution à 0,1 p. 100. L'isoélectrofocalisation dure 24 heures pour une tension constante aux bornes de 400 volts.

— Pour la récupération des fractions, on enfonce dans le gel une grille formée de trente compartiments égaux. Le contenu de chaque compartiment est récupéré à l'aide d'une spatule, remis en suspension dans 10 ml d'eau distillée, et filtré sur microcolonne LKB. Après rinçage des colonnes par 10 ml d'eau distillée, on effectue sur chacune des solutions recueillies une mesure du pH et de la densité optique à 230 nm.

3. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS.

3.1. Principe (264).

Pour déterminer les poids moléculaires apparents des fractions vaccinantes, nous avons utilisé la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium (SDS).

Le gel de polyacrylamide résulte de la copolymérisation de l'acrylamide et d'un agent de réticulation tel que le N-N' méthylène bis acrylamide ou BIS, sous l'influence d'un système catalyseur rédox comme le mélange persulfate de sodium - N, N, N', N' - tétraméthylène diamine (TEMED). Le rapport des concentrations en acrylamide et en BIS détermine les propriétés du gel (viscosité, densité, élasticité, porosité). En faisant varier ce rapport le long du gel, il est donc possible d'obtenir un gradient de porosité (178, 194).

Si l'on chauffe une solution de protéines en présence d'urée qui détruit les liaisons hydrogènes, de βmercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures et empêche la réoxydation des groupements thiols, de SDS qui se fixe sur les chaînes polypeptidiques à raison de une molécule pour deux résidus d'acides aminés, on obtient finalement des chaînes linéaires chargées négativement. Placées dans un champ électrique, elles se comportent comme des anions et la migration électrophorétique ne dépend plus que de la longueur de la chaîne, c'est-à-dire du poids moléculaire.

Pour un gel de porosité convenable, il existe alors une relation linéaire entre la distance relative de migration et le logarithme du poids moléculaire. L'utilisation d'un gradient de porosité a pour effet d'améliorer la linéarité de la droite d'étalonnage obtenue à partir d'un mélange de protéines témoins, particulièrement dans la zone des P.M. élevés (156).

3.2. Matériel.

- Cuve d'électrophorèse pour gels de polyacrylamide verticaux, Pharmacia GE-4 II.
- Alimentation électrique pour électrophorèse ISCO modèle 492.
- Cuve de décoloration pour gels, Pharmacia GD- 4 II et son alimentation électrique DPS.
- Gels de polyacrylamide à gradient de porosité PAA 2/16 Pharmacia.
- Photomètre-intégrateur enregistreur PHI 6 VERNON.

3.3. Solutions utilisées (199).

3.3.1. Tampon électrophorétique.

TRIS	0,04 M
acétate de sodium	0,02 M
EDTA	2 mM
SDS	0,2 p. 100
eau distillée	q.s.p. 1 litre

Le pH est amené à 7,4 avec de l'acide acétique pur.

3.3.2. Tampon pour échantillons.

Il s'agit d'un tampon TRIS-HCl 10 mM de pH 8, contenant du Bleu de Bromophénol.

3.3.3. Solution solubilisante.

urée ..... 4,86 g
βmercaptoéthanol ..... 12 μl
SDS ..... 0,08 g
eau distillée ..... q.s.p. 10 ml

3.3.4. Solution de fixation, éliminant le SDS.

isopropanol ..... 250 ml
acide acétique ..... 100 ml
eau distillée ..... q.s.p. 1 litre

3.3.5. Solution de coloration.

Bleu de Coomassie à 0,02 p. 100 dans l'acide acétique à 7 p. 100.

3.3.6. Solution de décoloration.

Acide acétique à 7 p. 100.

3.4. Protocole expérimental.

L'échantillon (ou les protéines témoins) est dissous dans le Tampon TRIS-HCl 10 mM à la concentration de 1 mg/ml. Après avoir été dilué de moitié à l'aide de la solution solubilisante, le mélange est porté à 100°C pendant 3 mn, puis ramené à la température du laboratoire. 20 μl d'échantillon sont alors déposés sur les plaques de gel PAA 2/16 qui ont déjà subi une pré-électrophorèse (1 heure à 70 volts).

L'électrophorèse proprement dite est faite en deux temps : 10 minutes à 300 volts, puis 2 h 30 à 150 volts.

Après migration, le gel est récupéré et placé dans les enveloppes-grilles de l'appareil à décoloration. Une électrophorèse (24 volts pendant 30 mn) dans la solution de fixation permet d'éliminer le SDS. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (16 heures). L'excès de colorant est éliminé par une électrophorèse (34 volts pendant 1 heure) dans la solution de décoloration.

Les plaques sont conservées dans l'acide acétique à 7 p. 100. Nous avons déterminé les distances relatives de migration à partir des enregistrements obtenus à l'aide du Photomètre-intégrateur VERNON.

4. L'analyse spectrographique.

4.1. La spectrographie U.V.

Les spectres U.V. ont été tracés à l'aide d'un spectrographe PYE-UNICAM SP 8-200. Les échantillons étaient dissous dans une solution aqueuse de NaCl 0,15 M.

4.2. La spectrographie I.R.

Les spectres I.R. ont été obtenus à l'aide d'un spectrographe LEITZ N° 150 à double faisceau. Les échantillons étaient inclus dans une micropastille de KBr.

5. L'analyse chimique.

5.1. Dosage des protéines.

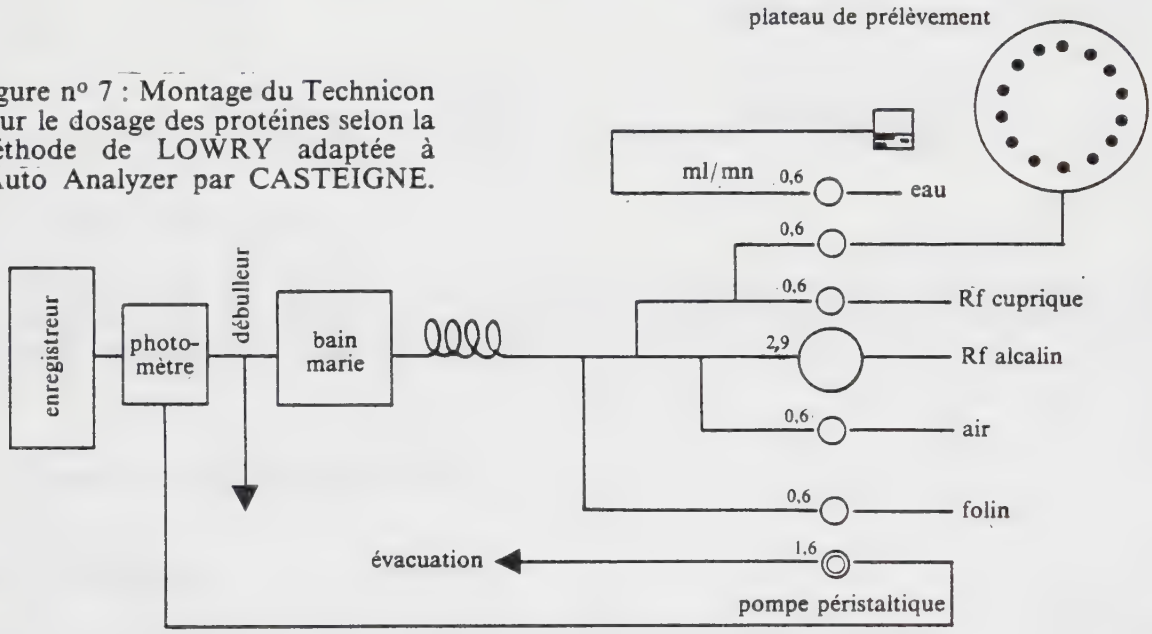
Nous avons utilisé la méthode de LOWRY adaptée à l'Auto Analyzer Technicon par CASTEIGNE (48). Les réactifs utilisés étaient les suivants :

- Réactif de FOLIN-CIOCALTEU du phénol (Produit Merck n° 9001), dilué au tiers avec de l'eau distillée extemporanément
- Réactif cuprique :
  $CuSO_4$, 5 H_2O ..... 1 g
  Tartrate de sodium ..... 2 g
  H_2O distillée ..... q.s.p. 100 ml
- Réactif alcalin :
  NaOH 10 N ..... 40 ml
  Na_2CO_3 ..... 42,4 g
  Eau distillée ..... q.s.p. 2000 ml

Le schéma des circuits de pompage est donné par la figure n° 7.

Chaque série de dosages comportait une gamme étalon de sérum albumine bovine (produit NBC) à des concentrations variant de 25 à 200 μg/ml.

Figure n° 7 : Montage du Technicon pour le dosage des protéines selon la méthode de LOWRY adaptée à l'Auto Analyzer par CASTEIGNE.



5.2. Dosage des acides aminés.

Chaque prise d'essai (0,5 à 1 mg) a été pesée après lyophilisation et hydrolysée par 2 ml d'HCl 6N, en ampoule scellée sous vide, et maintenue pendant 24 heures à 100°C. Après élimination de l'acide chlorhydrique par distillation sous pression réduite, les hydrolysats obtenus ont été analysés à l'aide d'un analyseur d'acides aminés BECKMAN —120 C selon la méthode de MOORE et STEIN (188), en suivant le mode opératoire proposé par SPACKMAN et coll. (236).

Les acides aminés neutres et acides ont été séparés sur résine échangeuse d'ions AA 15, les acides aminés basiques sur résine PA 35 (Produits BECKMAN).

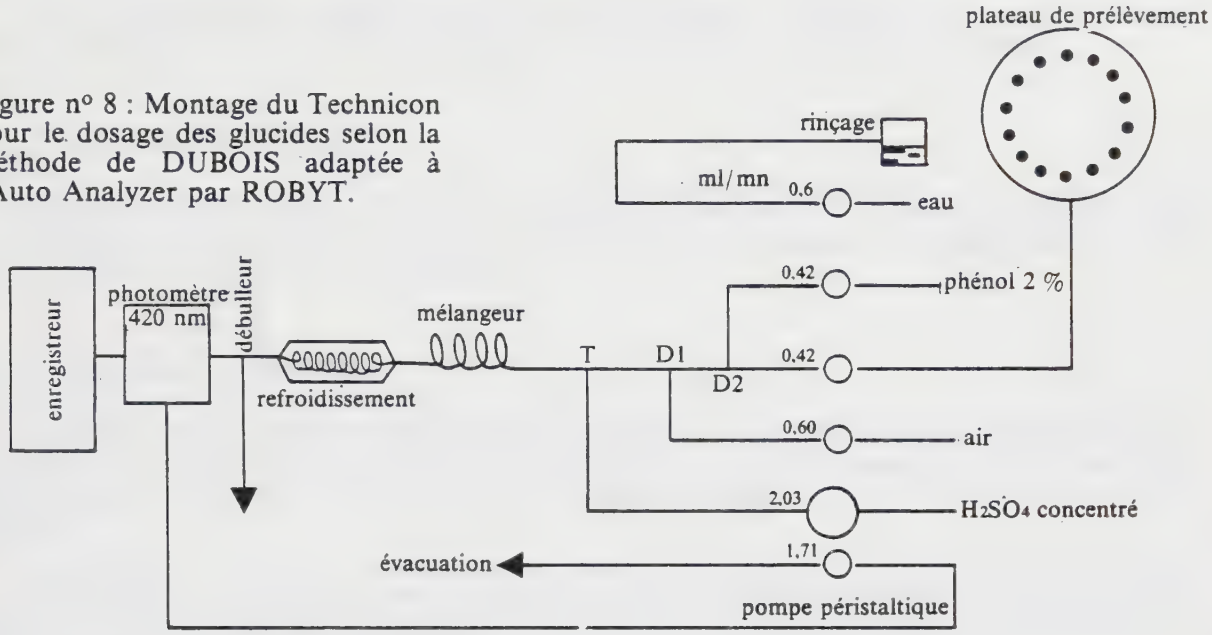
Les dosages ont été effectués par la réaction colorée obtenue en présence de ninhydrine.

5.3. Dosage des glucides.

Nous avons utilisé la méthode de DUBOIS adaptée à l'Auto Analyzer Technicon par ROBYT et BEMIS (221). Les réactifs étaient les suivants :
- Phénol pour analyse (Produit MERCK n° 206), solution aqueuse à 2 p. 100.
- Acide sulfurique pur (Produit MERCK n° 748).

Le schéma des circuits de pompage est donné par la figure n° 8.

Figure n° 8 : Montage du Technicon pour le dosage des glucides selon la méthode de DUBOIS adaptée à l'Auto Analyzer par ROBYT.



5.4. Dosage du phosphore.

Le phosphore inorganique a été dosé après minéralisation à l'aide d'un mélange sulfo-perchlorhydrique, transformation en phospho-molybdate puis réduction en bleu de molybdène suivant la méthode de FISKE et SUBBAROW (102).

6. Mesure du pouvoir vaccinant.

6.1. Les animaux.

Le contrôle du pouvoir immunisant des différentes fractions a été effectué sur des souris Balb/C des deux sexes, âgées d'environ 2 mois et pesant entre 18 et 20 g.

Ces animaux provenaient d'une colonie close entretenue au laboratoire. Ils étaient nourris de croquettes UAR AO3 et placés pendant l'épreuve dans des cages, l'expérience se déroulant dans un local stérilisable par les ultra-violets et climatisé. Chaque lot comprenait un nombre égal de souris mâles et femelles, réparties séparément à raison de dix animaux par cage.

6.2. La souche pathogène.

Pour éprouver les souris vaccinées, nous avons utilisé la souche C-5 S de **S. typhimurium,** provenant de l'Institut Pasteur de Paris. La virulence de cette souche hautement pathogène a été entretenue par passage sur les souris. L'injection intrapéritonéale d'une dose létale de la bactérie et le prélèvement stérile de la rate de l'animal, dès la mort de celui-ci, ont permis de

conserver cette souche à partir des fragments de rate lyophilisés et conservés en ampoules scellées sous vide.

Les cultures de bactéries ont été réalisées en introduisant stérilement un fragment de rate lyophilisé dans 10 ml de bouillon «Eugonbroth» (E.D. Mérieux) qui a été ensuite incubé pendant 24 heures à 34°C.

Une numération des germes vivants et un contrôle de l'homogénéité de la culture ont alors été effectués sur boîtes de Pétri (gélose additionnée de 3 p. 100 d'Eugonbroth).

6.3. Vaccins vivants témoins.

Comme vaccins vivants, nous avons utilisé soit la souche M-206, soit un mutant Ra de **S. typhimurium.** Ce dernier, déficient en UDP-glucose 4-épimérase, provenait également de l'Institut Pasteur de Paris (Pr LE MINOR).

6.4. Protocole de vaccination.

Chaque souris a reçu quotidiennement, pendant 5 jours consécutifs, 200 μg de fraction antigénique dissoute dans 0,2 ml d'eau distillée. Cette dose a été administrée à l'aide d'une sonde œsophagienne adaptée à l'extrémité d'une seringue à insuline, pour avoir une meilleure précision.

Parallèlement, des lots de souris ont été vaccinés respectivement par l'antigène brut, c'est-à-dire la fraction Ⓢ par la souche M-206 et par le mutant Ra de **S. typhimurium.** Pour les vaccins vivants, la dose quotidienne était de 10^6 bactéries vivantes.

6.5. Epreuve.

Les animaux ont été éprouvés un mois après la première vaccination, à l'aide d'une dose létale correspondant à 10^4 germes pathogènes (**S. typhimurium** C-5), introduite par la même voie, sous un volume de 0,2 ml.

Un lot de 20 souris non vaccinées a été utilisé chaque fois comme «lot témoin».

6.6. Expression des résultats.

Le recensement des souris mortes a été effectué chaque matin à 9 heures, pendant 23 jours consécutifs. Pour chaque lot, nous avons calculé les pourcentages de mortalité et de survie, l'indice d'efficacité (I.E.) donné par la relation suivante :

$$\text{I.E.} = \frac{\text{(pourcentage de mortalité des témoins)} - \text{(pourcentage de mortalité de l'échantillon)}}{\text{(pourcentage de mortalité des témoins)}} \times 100$$

et la durée moyenne de survie (DMS) donnée par la relation suivante :

$$\text{DMS} = \frac{\text{somme des jours de survie des animaux morts}}{\text{nombre des animaux morts}}$$

CHAPITRE 2

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Etude des principales caractéristiques de la fraction ⑤.

1.1. Rendement des préparations.

La quantité d'antigène brut obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium, à partir de 130 litres de surnageant de culture, est égale à 216 g de produit sec (fraction ③). Ce dernier contient envion 9 p. 100 de constituants de poids moléculaires supérieurs à $3x10^5$ (fraction ④) et 91 p. 100 de constituants de poids moléculaires inférieurs à $3x10^5$ (fraction ⑤).

1.2. Pouvoir immunisant.

Les résultats comparatifs des essais de vaccination de la souris, par voie orale, à l'aide de ces trois fractions sont donnés par le tableau **1.** Bien que la fraction ⑤ soit légèrement moins efficace que la fraction ④ pour la protection de l'animal, du fait de sa plus grande abondance dans le surnageant de culture, elle représente une matière première plus intéressante pour les opérations de purification du constituant actif.

Tableau n° **1** : étude du pouvoir protecteur des fractions isolées à partir du surnageant de culture de **S. typhimurium** M-206 (durée de l'observation : 12 jours, dose d'épreuve administrée par voie orale : 10^4 germes).

Nature des vaccins	Nombre de morts	Durée moyenne de survie (DMS exprimée en jours)	Pourcentage de survie
Témoins non vaccinés	19/19	7,8	0
Fraction ③	17/20	8,6	15
Fraction ④	16/20	8,3	20
Fraction ⑤	17/20	8,6	15

1.3. Analyse chimique.

L'étude de la composition chimique de la fraction ⑤ (tableau 2) montre que celle-ci est constituée essentiellement de protéines et d'une petite quantité d'oses neutres. On notera également l'absence de lipides extractibles par les solvants organiques. Nous n'avons cependant pas dosé les acides gras liés éventuels.

Tableau n° 2 : résultats de l'analyse chimique de la fraction ⑤(P.M. $<3 \times 10^5$ daltons).

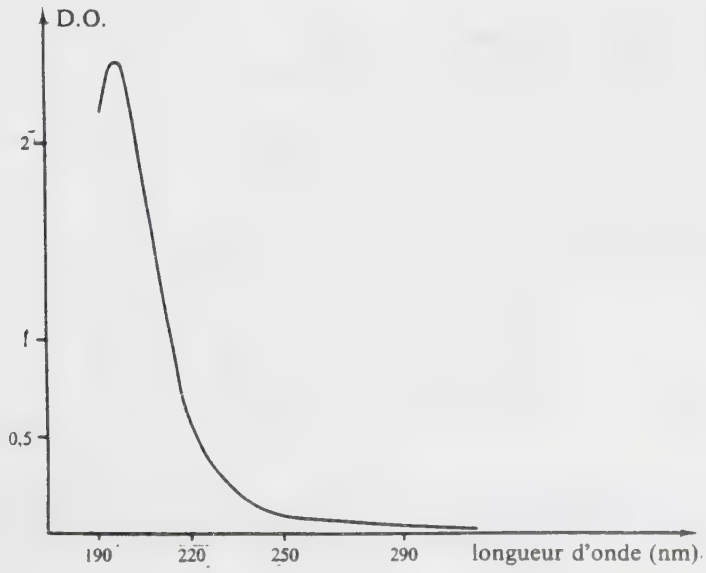
Constituants dosés	Teneur en g p. 100
Protéines totales (Lowry)	75
oses neutres (orcinol)	2,9
oses neutres (phénol)	1,1
phosphore total	traces
lipides neutres (extrait acétonique)	0
lipides totaux (chloroforme-méthanol ; 2 : 1)	0,8

1.4. Analyse spectrographique.

Le spectre UV de la fraction ⑤ est donné par la figure 9. On constate qu'il n'y a pas d'absorption dans la zone habituelle des protéines (280 nm), ce qui traduit une absence d'acides aminés aromatiques dans les constituants. Le maximum d'absorption se situe vers 195 nm, zone où pratiquement tous les composés organiques absorbent les radiations UV.

En fonction de ce spectre, nous avons choisi un filtre de 254 nm pour la détection des pics séparés par chromatographie. Un contrôle supplémentaire a été effectué sur chaque éluat par mesure de la densité optique soit à 230, soit à 210 nm.

Figure 9 - Spectre U.V. de la fraction ⑤ (0,05 mg/ml).



2. Fractionnement chromatographique.

2.1. Chromatographie d'exclusion.

2.1.1. Ultrogel AcA 34 (figure 10).

Après avoir constaté que tous les constituants de la fraction⑤avaient un poids moléculaire inférieur au domaine de fractionnement de l'Ultrogel AcA 22 (coefficient de partage ou Kav≃1), nous avons essayé de séparer ces derniers sur colonne d'Ultrogel AcA 34.

Les résultats obtenus montrent que la fraction ⑤ n'est pas homogène. Toutefois, les constituants présents ayant tous des Kav compris entre 0,9 et 1, nous avons essayé un autre gel de porosité plus faible.

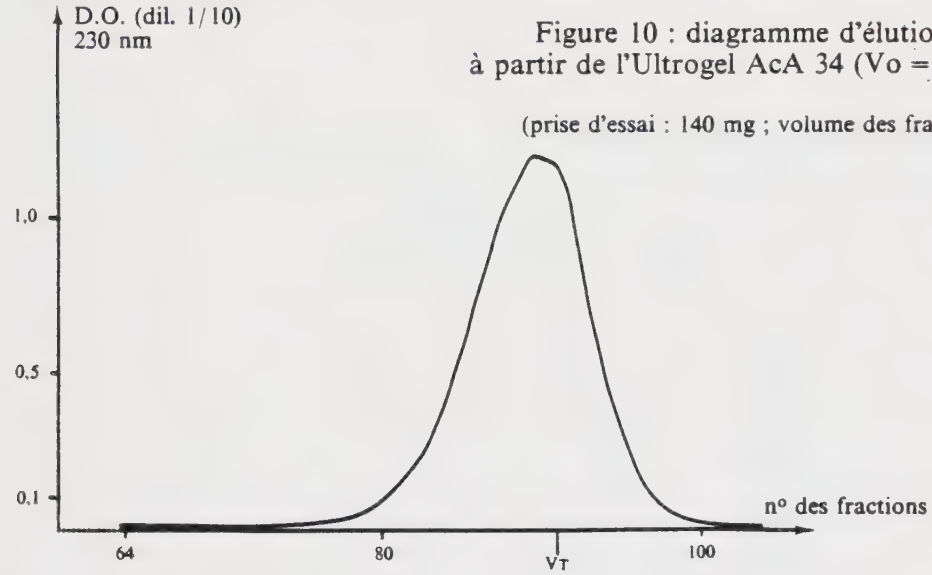


Figure 10 : diagramme d'élution de la fraction⑤ à partir de l'Ultrogel AcA 34 (Vo = 164 ml, V_T = 455 ml).

(prise d'essai : 140 mg ; volume des fractions : 5 ml)

2.1.2. Ultrogel AcA 54 (figure 11).

L'utilisation de ce gel n'apporte pas une meilleure résolution. On obtient un grand pic dissymétrique dont le sommet correspond à un Kav égal à 0,76.

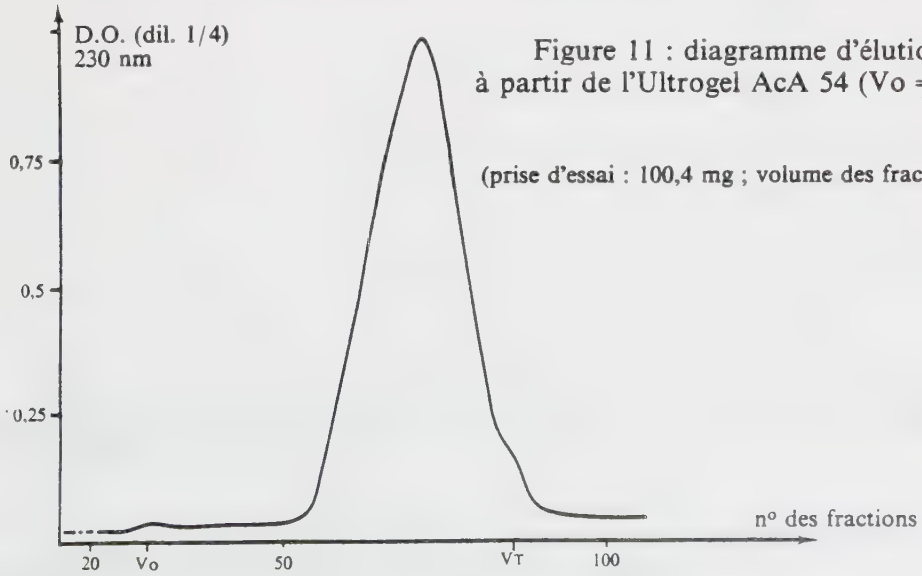


Figure 11 : diagramme d'élution de la fraction⑤ à partir de l'Ultrogel AcA 54 (Vo = 146 ml, V_T = 414 ml).

(prise d'essai : 100,4 mg ; volume des fractions : 4,8 ml)

Figure 12 : diagramme d'élution de la fraction⑤
à partir de l'Ultrogel AcA 202 (Vo = 140 ml ; V_T = 435 ml)

(prise d'essai : 100,6 mg ; volume des fractions : 5 ml)

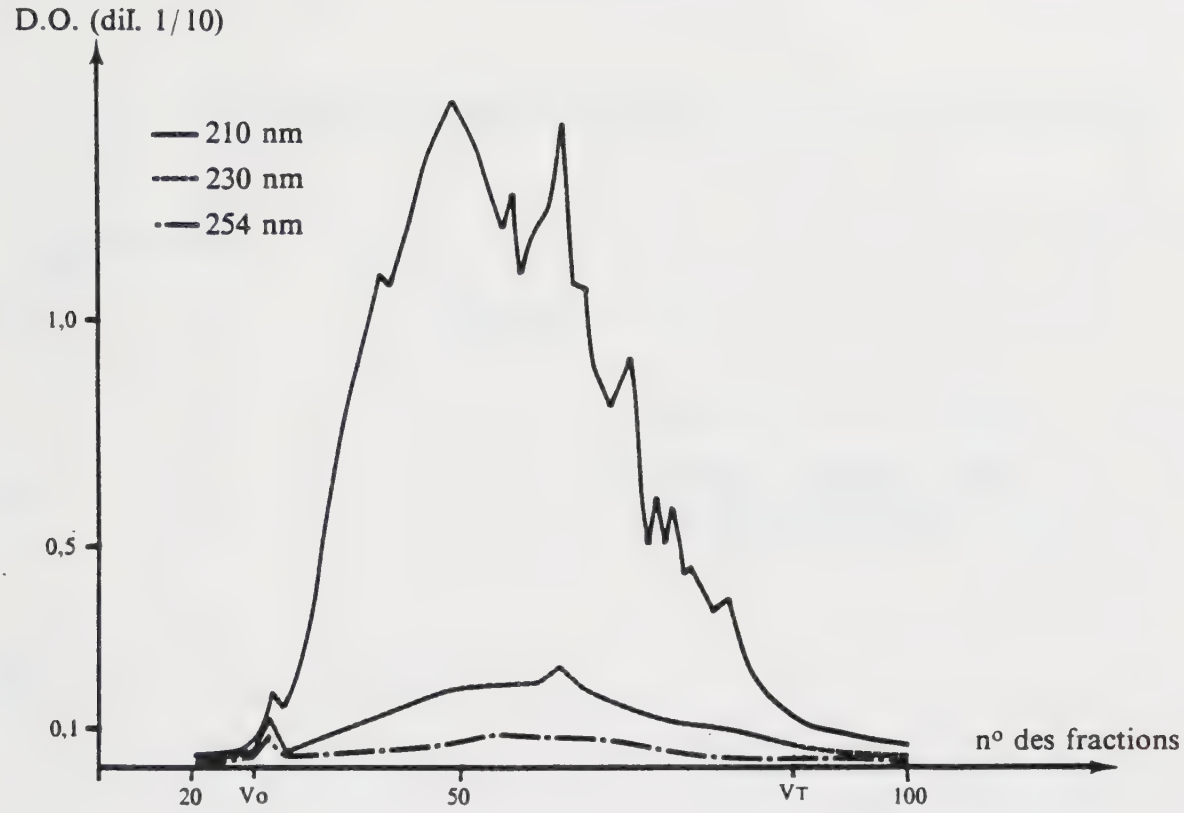


Figure 13 : diagramme d'élution de la fraction⑤
à partir de l'Ultrogel AcA 202 (Vo = 140 ml ; V_T = 435 ml)

(prise d'essai : 20 mg ; volume des fractions : 3 ml)

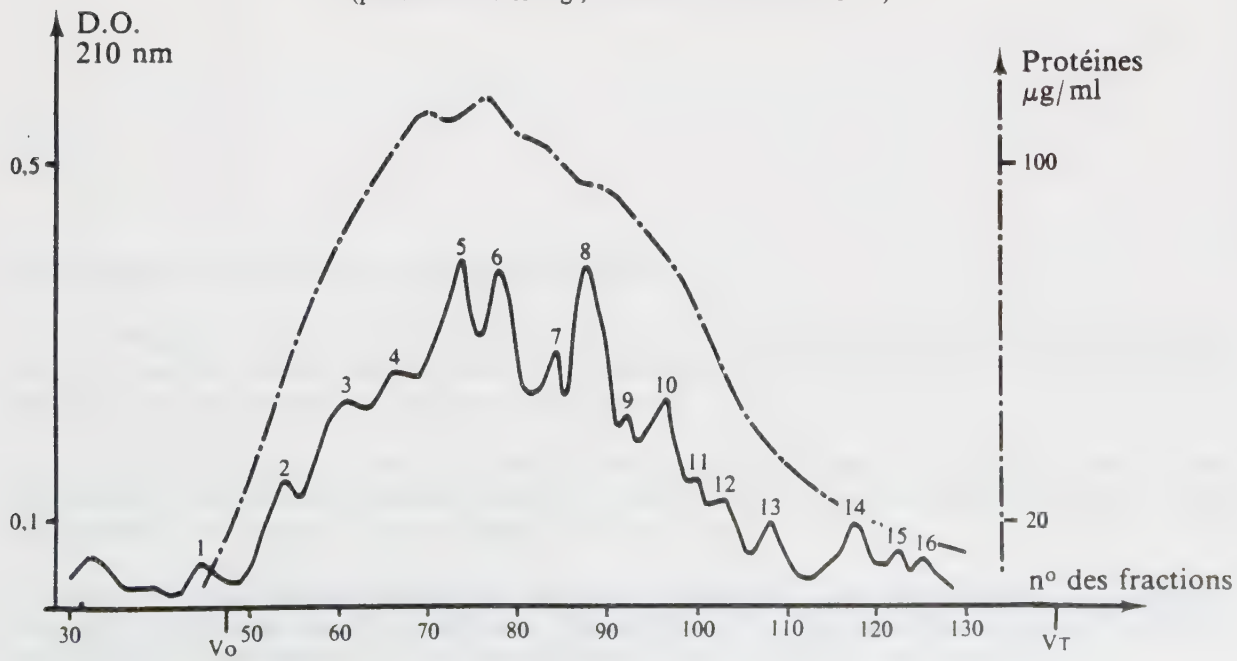
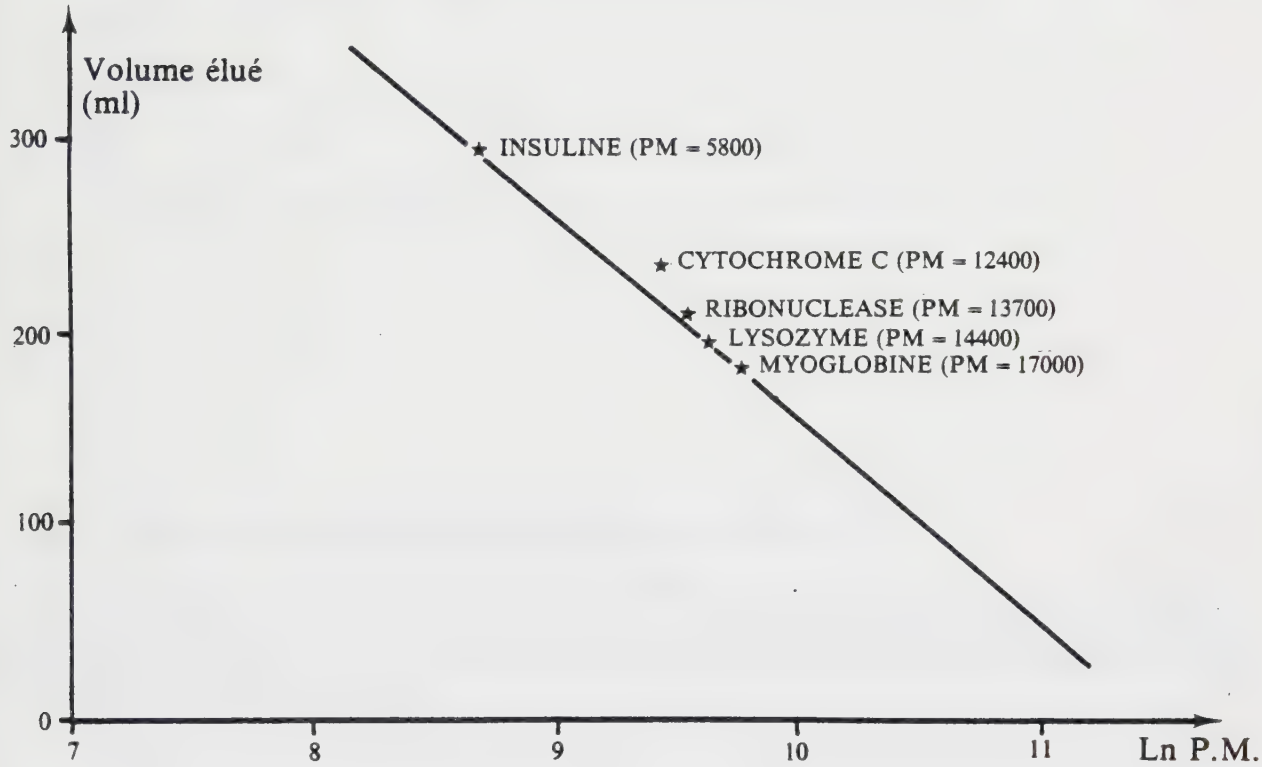


Figure 14 : courbe d'étalonnage des poids moléculaires à partir de l'Ultrogel AcA 202



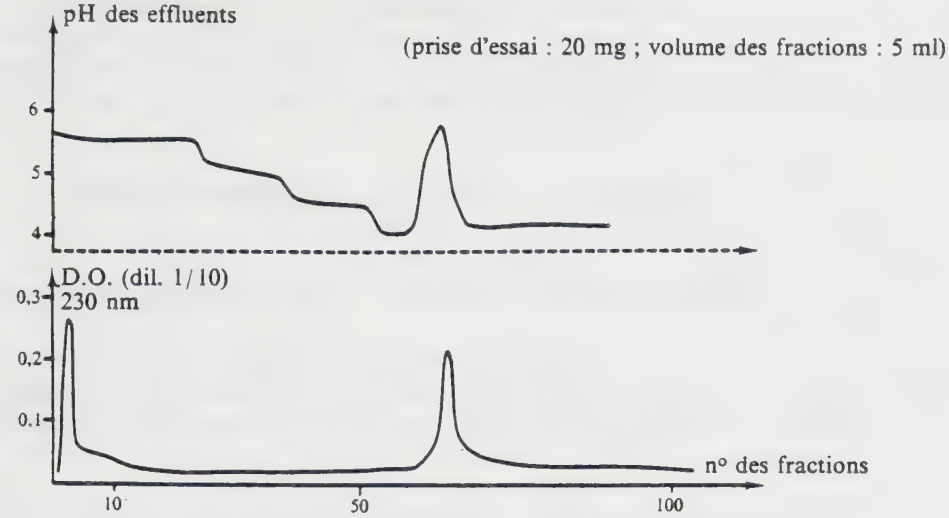
2.2. Chromatographie par échange d'ions (figure 15).

Le diagramme d'élution de la fraction ⑤ à partir du DEAE-Sepharose CL-6 B montre que cette fraction contient deux groupes de constituants de pHi très distincts. Ceci sera confirmé plus loin, par les données de l'isoélectrofocalisation.

Il apparaît donc qu'un fractionnement satisfaisant, par chromatographie par échange d'ions, ne pourra être obtenu qu'à condition d'opérer en deux temps, c'est-à-dire d'utiliser successivement un échangeur de cations et un échangeur d'anions.

On peut noter qu'avec l'échangeur utilisé, il se produit au voisinage de pH4 une remontée brusque et transitoire du pH de l'effluent. Ceci correspond vraisemblablement à la fixation des ions CH_3COO^- du tampon sur les groupements ionisés du DEAE-Sepharose CL-6 B.

Figure 15 : diagramme d'élution de la fraction⑤à partir du DEAE-Sepharose CL-6 B

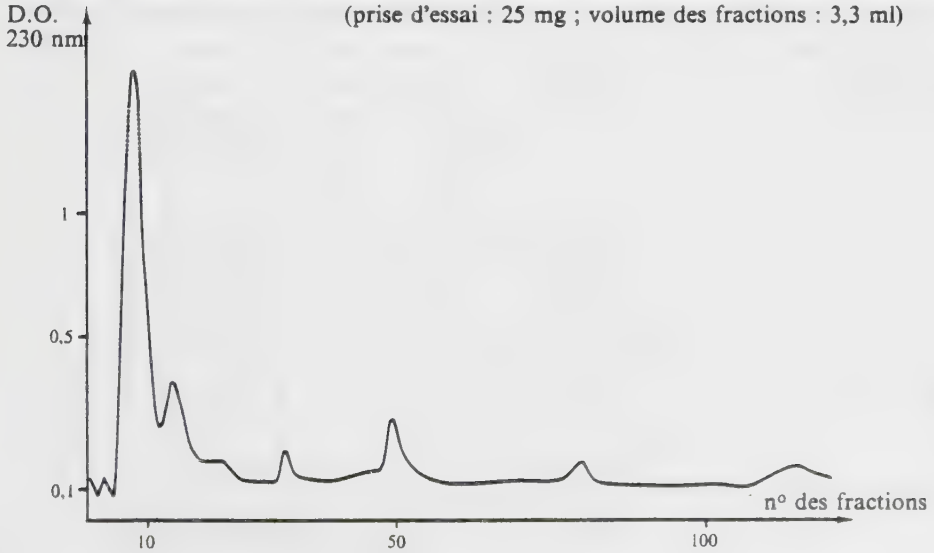


2.3. Chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite (figure 16).

Les résultats obtenus confirment l'hétérogénéité de la fraction ⑤ . On peut noter également que dans les conditions opératoires utilisées, la majorité des constituants est trop rapidement éluée. Il est peu probable que ce type de gel permette de séparer en une seule opération la totalité des constituants de la fraction ⑤ .

D'autre part, les prises d'essais utilisables sont trop faibles pour aboutir à une méthode préparative.

Figure 16 : diagramme d'élution de la fraction⑤à partir de l'Hydroxylapatite



3. Fractionnement par isoélectrofocalisation.

Considérant que la chromatographie d'exclusion ne permet pas d'obtenir une séparation correcte des constituants de la fraction ⑤, tenant compte d'autre part des données de la chromatographie par échange d'ions montrant que cette fraction contient deux groupes de constituants de pHi très différents, nous avons fait appel à l'isoélectrofocalisation pour isoler ces derniers.

3.1. Isoélectrofocalisation sur gradient de saccharose.

3.1.1. Avec gradient de pH variant de 3 à 10 (Pharmalyte*).

La figure 17 indique la densité optique et le pH des fractions recueillies. En fonction des variations de la densité optique, nous avons regroupé le contenu des tubes à essais en 7 fractions différentes correspondant chacune à une zone bien définie du gradient de pH.

3.1.2. Avec gradient de pH variant de 3,5 à 10 (Ampholine*).

La figure 18 montre que les résultats obtenus sont identiques, exception faite pour les fractions F et G qui sont ici confondues.

3.1.3. Bilan pondéral.

A partir de 45 isoélectrofocalisations effectuées sur des prises d'essais de 100 mg de fraction ⑤, nous avons recueilli suffisamment de produits pour entreprendre une étude du pouvoir vaccinant de chacune des nouvelles fractions.

En fait, il est apparu que les fractions séparées par cette méthode étaient fortement contaminées par du saccharose provenant du gradient. La prolongation du temps de dialyse n'a pas permis d'éliminer complètement ce contaminant ; c'est pourquoi nous avons dosé spécifiquement ce dernier pour pouvoir connaître la quantité exacte d'antigène donnée aux animaux.

Les pourcentages relatifs exprimés dans le tableau **4** ont été calculés après déduction de la quantité de saccharose présente.

Tableau **4** : Définition et rendement des fractions séparées par isoélectrofocalisation.
(Les pourcentages indiqués correspondent à une moyenne obtenue à partir de 10 fractionnements).

Ordre des fractions	Zones de pH	Pourcentages relatifs
fraction A	11,5 ⩽ pH	1
fraction B	8,5 ⩽ pH < 11,5	7,8
fraction C	6 ⩽ pH < 8,5	11,5
fraction D	5 ⩽ pH < 6	13,6
fraction E	4 ⩽ pH < 5	56,5
fraction F	3 ⩽ pH < 4	7,5
fraction G	pH < 3	2,1

Figure 17 : isoélectrofocalisation sur gradient de saccharose
(8°C. 300 V - 48 h). Pharmalyte* 3-10. Dépôt : 100 mg de M-206 ⑤

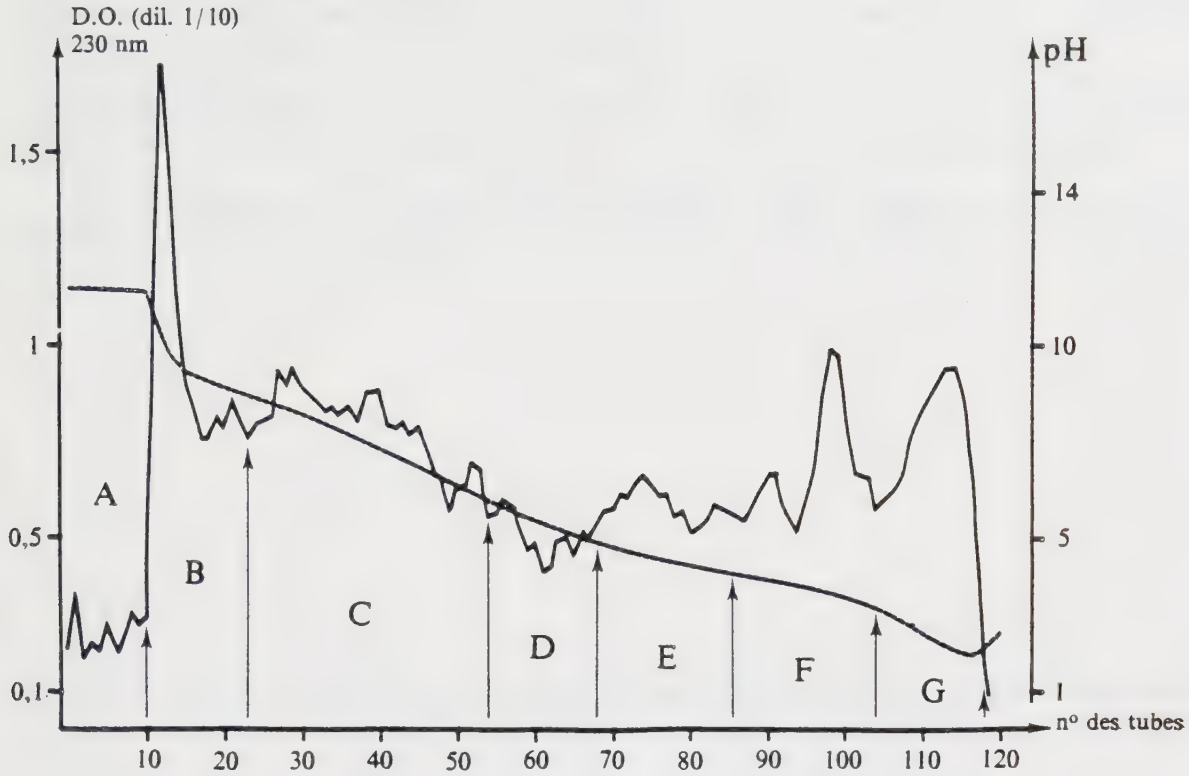
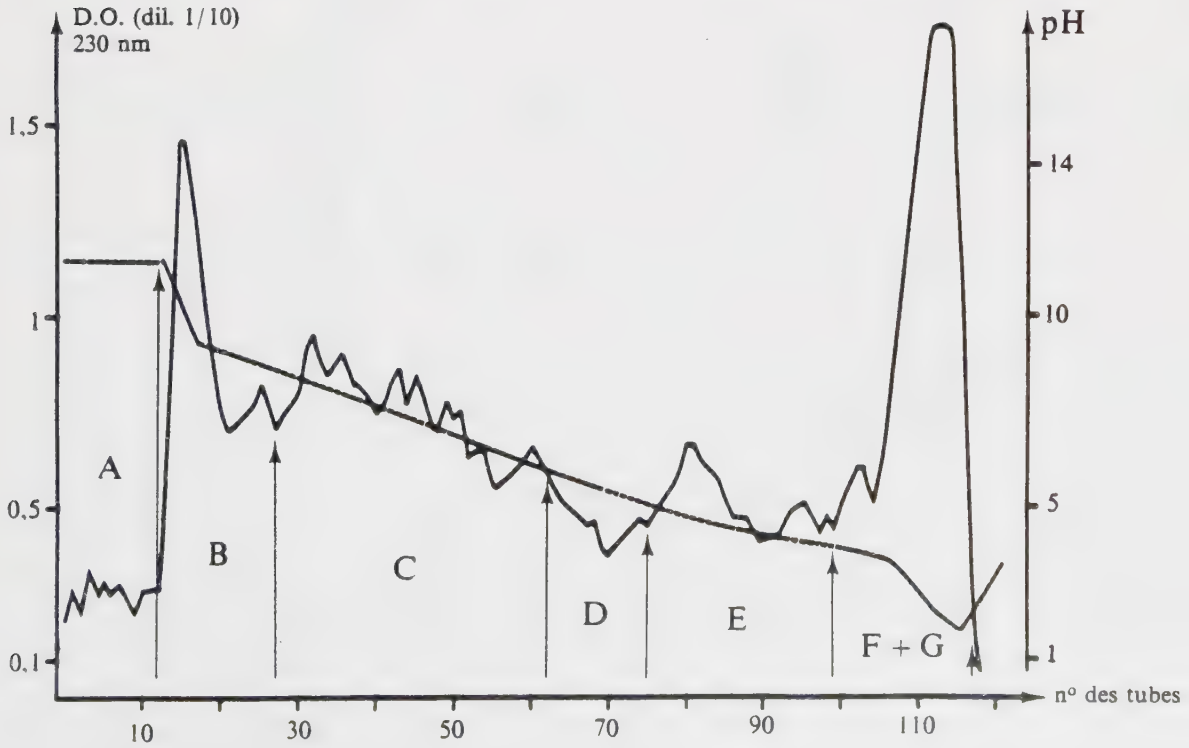


Figure 18 : isoélectrofocalisation sur gradient de saccharose
(8°C. - 300 V - 48 h). Ampholine* 3,5-10. Dépôt : 100 mg de M-206 ⑤



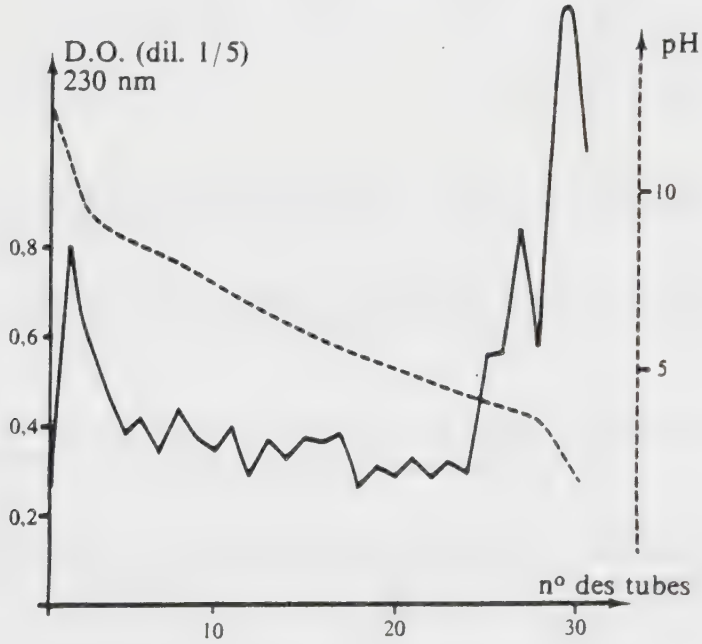
3.2. Isoélectrofocalisation sur gel granuleux.

Pour éviter la contamination des fractions par le saccharose, nous avons fait appel à la technique d'isoélectrofocalisation sur gel granuleux. Celle-ci présente d'autre part l'avantage considérable de permettre l'utilisation de prises d'essais nettement plus importantes.

La figure 19 montre que la répartition des constituants en fonction du gradient de pH est sensiblement identique à celle que l'on observe en travaillant sur gradient de saccharose.

Pour le moment, nous n'avons pas encore fait de bilan pondéral sur les fractions ainsi obtenues, pas plus que nous n'avons étudié les propriétés vaccinantes de ces dernières.

Figure 19 : isoélectrofocalisation sur gel granuleux Sephadex IEF 5 % - Ampholine* 3,5-10. (8°C - 400 V - 24 h). Dépôt : 400 mg de M-206 ⑤



4. Etude du pouvoir protecteur des fractions séparées.

Les résultats de l'étude de la protection de la souris vis-à-vis d'une dose d'épreuve de bactéries pathogènes sont donnés dans le tableau **5** :

Tableau **5** : étude du pouvoir protecteur des fractions isolées à partir de l'isoélectrofocalisation sur gradient de saccharose.
(Dose d'épreuve administrée par voie orale = 10^4 germes [**S. typhimurium** - C5])

nature des vaccins	nombre de morts		durée moyenne de survie (DMS exprimée en jours)		pourcentage de survie		indice d'efficacité	
témoins non vaccinés	11/20	16/20	9,1	11,3	45	20	—	—
S. typhimurium Ra	2/19	3/19	12	12,6	89	84	80	80
fraction M-206⑤	6/19	6/19	9,6	9,6	68	68	41	66
fraction A	6/20	11/20	9,5	14,4	70	45	45	31
fraction B	3/20	3/20	10	10	85	85	72	81
fraction C	2/20	15/20	9	17	90	25	81	6
fraction D	8/20	11/20	9,7	11,8	60	45	27	31
fraction E	5/20	5/20	9,8	9,8	75	75	54	70
fraction F	2/20	4/20	9,5	12	90	80	81	75
fraction G	6/20	10/16	9,6	13,3	70	37	45	22
durée de l'observation	12 j.	23 j	12 j	23 j	12 j	23 j	12 j	23 j

Pour des raisons que nous expliciterons dans la discussion générale, nous avons distingué les pourcentages de survie observés au 12e jour et au 23e jour.

Nous avons fait figurer dans le tableau **6** les indices d'efficacité des différents antigènes rapportés à celui du meilleur vaccin vivant, c'est-à-dire le mutant Ra.

Tableau **6** : indices d'efficacité des fractions antigéniques rapportés à celui de **S. typhimurium** Ra (vaccin vivant) à deux dates d'observation d'une même épreuve.

	S. typhimurium Ra	fraction M-206⑤	fraction A	fraction B	fraction C	fraction D	fraction E	fraction F	fraction G
12e jour	1	0,51	0,56	0,90	1,01	0,34	0,67	1,01	0,56
23e jour	1	0,83	0,39	1,01	0,07	0,39	0,87	0,93	0,27

Il apparaît que les fractions B et F ont un pouvoir immunisant tout à fait comparable à celui du vaccin de référence. Notons, en ce qui concerne la fraction C, une nette discordance entre les résultats observés au 12e jour et au 23e jour.

5. Détermination du poids moléculaire des différentes fractions.

5.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

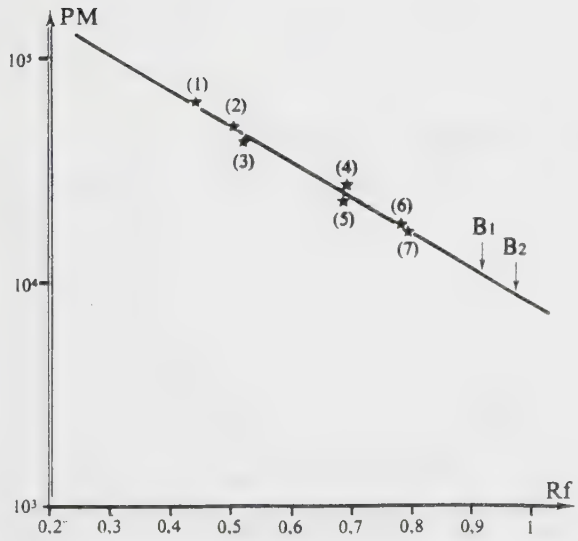
Les résultats de la détermination des poids moléculaires des différentes fractions sont donnés par le tableau 7 :

Tableau 7 : détermination des P.M. apparents

	nombre de pics	P.M. apparent
fraction A	1	10500
fraction B	2	9000 11000
fraction C	1	9000
fraction D	3	10500 15000 20000
fraction E	1	10500
fraction F + G	2	10500 11000

Ces chiffres ont été calculés à partir de la droite d'étalonnage obtenue pour les protéines témoins (figure 20).

Figure 20 : détermination du P.M. apparent de la fraction B par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS



	P.M.	Rf
1 SAB	65000	0,444
2 γ Globuline 1	50000	0,508
3 ovalbumine	43000	0,522
4 chymotrypsinogène	27500	0,696
5 γ Globuline 2	23000	0,690
6 ferritine	18500	0,787
7 myoglobine	17200	0,794

5.2. La chromatographie d'exclusion.

Jusqu'à présent, nous n'avons étudié que la fraction B, c'est-à-dire celle dont le pHi se situe entre 8,5 et 11.

En chromatographie sur colonne d'Ultrogel AcA 202 (figure 21), cette fraction donne deux pics bien distincts. Seul le premier pic présente un caractère macromoléculaire ; toutefois, son Kav, égal à 0,98, est trop proche de 1 pour qu'on puisse en déduire avec précision la valeur du poids moléculaire. Le second pic, dont le volume de rétention est supérieur à celui des petites molécules telles que le chlorure de sodium, contient vraisemblablement des contaminants de petite taille.

On retrouve ces deux mêmes pics dans la chromatographie sur Sephadex G-75 «superfine» (figure 22). Le Kav du pic 1 est ici légèrement inférieur (Kav = 0,91), ce qui, compte tenu du domaine de séparation du gel utilisé, permet d'affirmer que le poids moléculaire est supérieur à 3000.

Ces résultats montrent qu'une analyse correcte de la fraction B par chromatographie d'exclusion nécessitera l'utilisation d'un gel de porosité plus faible, tel que le Sephadex G-50 «superfine».

Pour l'instant, l'analyse de la fraction B s'est limitée à un spectre UV de cette fraction (figure 23), ainsi qu'à la recherche des acides aminés et des glucides.

Les pics 1 séparés sur Ultrogel AcA 202 et sur Sephadex G-75 ont donné une réaction positive avec le réactif des protéines de Folin, mais également avec les réactifs des glucides, qu'il s'agisse du mélange phénol-acide sulfurique ou du mélange anthrone-acide sulfurique.

Etant donné que les réactions colorées des glucides pouvaient être éventuellement faussées par la présence de petites quantités de saccharose provenant du gradient utilisé en isoélectrofocalisation, nous avons refait ces réactions sur une fraction B obtenue par isoélectrofocalisation sur gel granuleux, c'est-à-dire en l'absence de saccharose. Les résultats obtenus dans ce cas ont été également positifs.

Il apparaît donc que le constituant macromoléculaire de la fraction B contient des acides aminés et des glucides.

Figure 23 : Spectre UV de la fraction B (0,8 mg/ml)

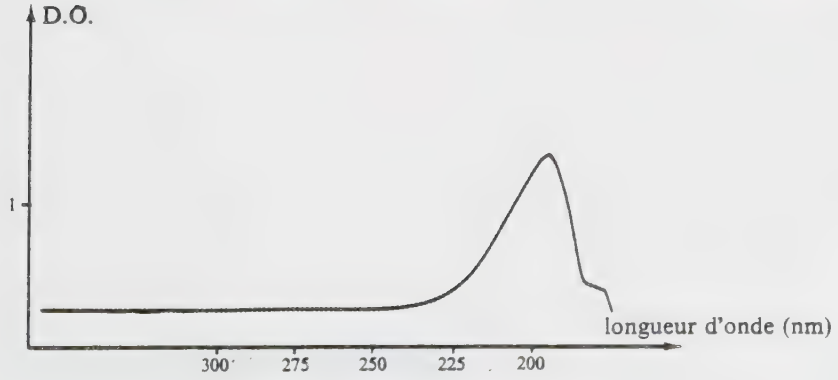


Figure 21 : Diagramme d'élution de la fraction B
à partir de l'Ultrogel AcA 202 (Vo = 140 ml, V_T = 435 ml)
(prise d'essai : 30 mg ; volume des fractions : 3 ml)

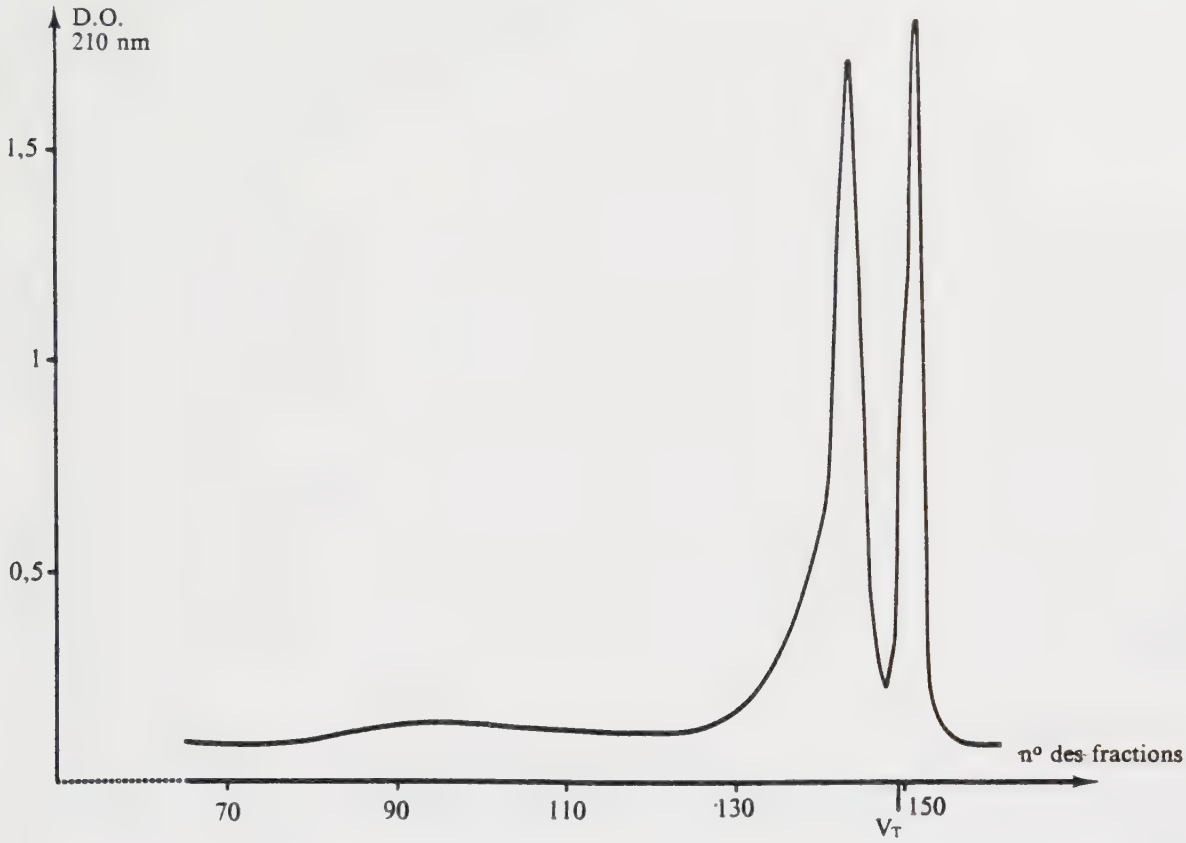
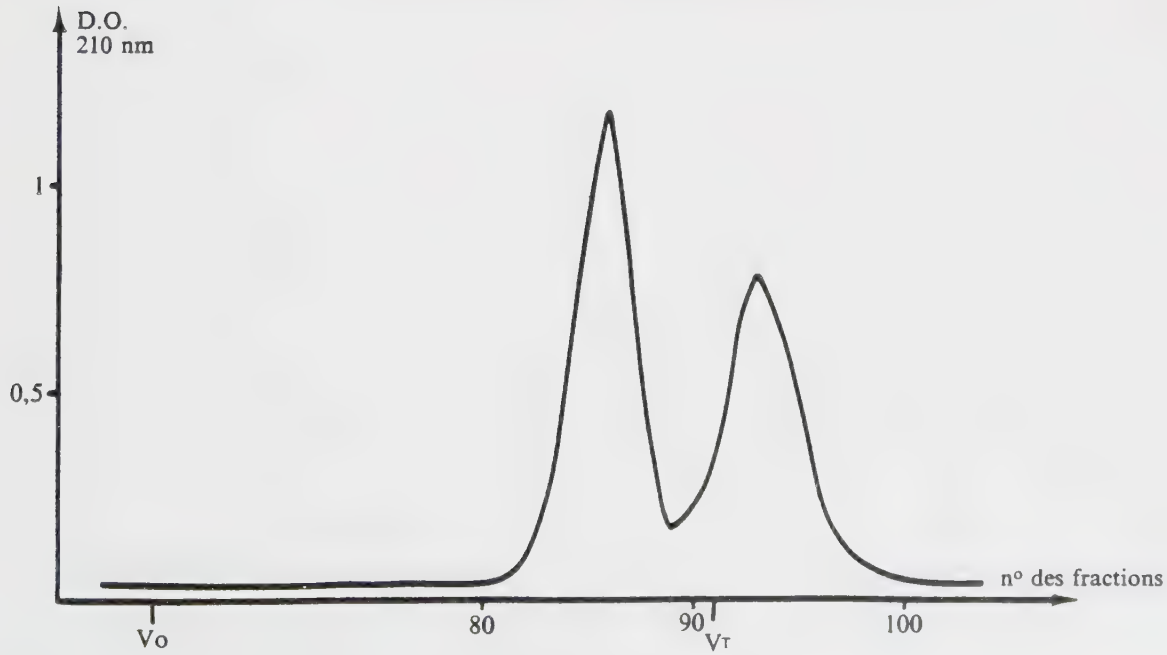


Figure 22 : Diagramme d'élution de la fraction B
à partir du Sephadex G-75 (Vo = 170 ml, V_T = 455 ml)
(prise d'essai : 30 mg ; volume des fractions : 5 ml)



DISCUSSION GENERALE

L'étude de la morbidité actuelle des fièvres typho-paratyphoïdiques fait apparaître une stabilisation du nombre de cas annuels qui se situe aux environs de 1 000 pour la France. Il s'agit essentiellement de fièvres dues au bacille d'Eberth. Toutefois, le maintien de l'obligation vaccinale pour les personnes soumises à un certain risque d'infection se trouve largement justifié par l'existence, en dehors des porteurs de germes convalescents, d'un grand nombre de sujets atteints de formes frustres ou inapparentes, mais aussi par la persistance de véritables zones d'endémies dans les pays dépourvus de structures sanitaires suffisantes. Le fait que les deux dernières épidémies à **S. typhi** étaient dues à des souches antibio-résistantes prouve également l'utilité de la vaccination.

Si le nombre des infections typho-paratyphoïdiques a considérablement régressé dans les pays développés, celui des salmonelloses «non typhoïdiques» ne cesse, en revanche, d'augmenter. Ni l'amélioration des conditions d'hygiène, ni la découverte de nouveaux moyens thérapeutiques n'ont réussi jusqu'à présent à renverser cette tendance, la dissémination des plasmides de résistance rendant de plus en plus fréquents les échecs de l'antibiothérapie. Seule l'utilisation de vaccins efficaces et pouvant être acceptés sans réticences permettrait d'enrayer la progression des toxi-infections à **Salmonella.**

Parmi les différents types de vaccins essayés dans des conditions expérimentales discutables, ce sont les vaccins buccaux vivants qui se sont révélés les plus aptes à protéger l'homme ou l'animal vis-à-vis d'une dose d'épreuve de salmonelles pathogènes administrée par voie orale. Pour pouvoir être utilisés sur le terrain, de tels vaccins devraient cependant être préparés de manière extemporanée ou conservés dans des conditions permettant la survie des bactéries. D'autre part, beaucoup d'individus hésiteraient à avaler des germes vivants, même devant le risque d'une épidémie. Ceci explique l'intérêt des recherches consacrées aux fractions antigéniques purifiées.

Divers essais portant sur des modèles expérimentaux cohérents, tels que la souris et l'un de ses agents pathogènes, **S. typhimurium,** montrent que l'on peut vacciner efficacement à l'aide de constituants bactériens. Ainsi, IVANOFF, CREACH, FONTANGES et coll. (74, 76, 131, 132, 133, 134, 136) ont prouvé l'existence, dans le surnageant de culture de **S. typhimurium** M-206, d'un facteur immunisant dont le pouvoir protecteur est comparable à celui du vaccin vivant correspondant.

Pour l'identification de ce facteur, ces auteurs ont utilisé les composés de poids moléculaires supérieurs à 3×10^5 obtenus par ultrafiltration directe du milieu de culture. Le fractionnement de ces constituants par chromatographie d'exclusion, suivie d'une chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite, leur a permis d'observer que plusieurs fractions se distinguant les unes des autres, soit par leur poids moléculaire, soit par leur charge électrique, pouvaient vacciner efficacement la souris par voie buccale, le support de l'activité paraissant être une chaîne glycoprotéique de poids moléculaire inférieur à 15 000.

En poursuivant ces travaux, nous avons constaté que si l'on faisait précéder l'ultrafiltration d'une précipitation par le sulfate d'ammonium, on recueillait la quasi totalité des antigènes contenus dans le surnageant de culture sous forme d'associations moléculaires de tailles relativement faibles. On pouvait donc penser que le facteur immunisant était ainsi libéré de ses différentes combinaisons et que cette technique rendrait plus facile la purification de ce dernier.

En fait, le nombre de constituants de poids moléculaires compris entre 1 000 et 15 000 daltons est tel que la chromatographie d'exclusion sur gels mixtes d'agarose et de polyacrylamide ne permet pas de séparer directement les composés actifs, malgré la très grande efficacité des colonnes employées.

La chromatographie par échange d'ions sur DEAE-Sepharose CL-6 B, ainsi que la chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite n'ont pas donné de résultats plus favorables, mais elles nous ont montré que les constituants du surnageant se répartissaient en deux groupes se distinguant très nettement par leur charge électrique. Cette observation nous a amené à utiliser l'isoélectrofocalisation préparative sur colonne, en gradient de saccharose, et sur couche

mince de gel granuleux pour le fractionnement du mélange d'antigènes.

L'isoélectrofocalisation permet de distinguer, dans ce dernier, sept groupes de constituants, dont trois, les fractions nommées B, C et F, correspondant respectivement aux pHi compris entre 8,5 et 11,5, 6 et 8,5, 3 et 4, possèdent un pouvoir immunisant égal ou légèrement supérieur à celui du vaccin vivant (**S. typhimurium** Ra) servant de référence.

Certes, il apparaît dans certains cas (en particulier pour la fraction C) une discordance entre le taux de survie établi après 12 jours d'observation et celui que l'on observe au 23e jour suivant l'administration de la dose d'épreuve de bactéries pathogènes (**S. typhimurium** C 5). Un bilan effectué sur plusieurs séries de vaccinations nous a montré que les résultats obtenus au 12e jour étaient les plus reproductibles. En prolongeant la durée de l'expérience, on constate en effet que certaines souris qui avaient survécu 12 jours à la dose d'épreuve de bactéries pathogènes meurent environ sept jours plus tard du fait d'une contamination massive à partir des animaux succombant de manière précoce. Ceci a pu être vérifié en comparant la survie des animaux répartis par cages de dix à celle d'un même nombre d'animaux placés en cage individuelle.

En fonction des résultats de la détermination des poids moléculaires apparents par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, on constate que toutes les fractions actives contiennent soit un composé de P.M. égal à 9000, soit un composé de P.M. égal à 11000.

Jusqu'à présent, seule la fraction B a été étudiée par une autre méthode. Son poids moléculaire, établi d'après les données de la chromatographie d'exclusion, serait inférieur à la valeur déterminée par électrophorèse. Ces résultats devront être précisés en faisant appel à un gel de porosité inférieure à celle des gels que nous avons utilisés. Il n'est cependant pas exclu que les chiffres obtenus grâce à l'électrophorèse soient trop élevés, compte tenu du fait que cette méthode s'applique normalement à des protéines vraies de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons, alors que nous avons affaire ici à des molécules dont les constituants ne sont pas tous des acides aminés. Les réactions colorées pratiquées sur la fraction B montrent en effet que celle-ci contient des glucides en plus des acides aminés.

D'autres travaux seront nécessaires pour connaître la composition exacte des fractions B, C et F séparées par isoélectrofocalisation. La fraction C devrait constituer un matériel particulièrement intéressant, dans la mesure où elle apparaît comme étant homogène. Des essais complémentaires ont en outre confirmé le pouvoir vaccinant de cette fraction.

Quels que soient les résultats ultérieurs concernant l'analyse des fractions B, C et F, nos travaux personnels montrent qu'on peut extraire les facteurs immunisants contenus dans le surnageant de culture de **S. typhimurium** M-206, sous forme de constituants de poids moléculaire apparent inférieur ou égal à 11000. Administrés à la souris par voie buccale, ces derniers protègent l'animal contre une dose létale de bactéries pathogènes correspondantes aussi efficacement et même mieux que le vaccin vivant de référence. Connaissant le pH isoélectrique des composés actifs, il devrait être relativement facile de séparer directement ces derniers des autres constituants du surnageant en faisant appel, par exemple, à une fixation sélective sur échangeur d'ions.

Ayant obtenu des résultats positifs en appliquant les mêmes techniques à des mutants R de **S. typhimurium** (75), nous pensons que les méthodes décrites devraient être applicables à d'autres espèces du genre **Salmonella.** On pourrait ainsi disposer de vaccins buccaux efficaces et faciles à utiliser pour la prévention des fièvres typho-paratyphoïdiques, mais aussi des salmonelloses.

CONCLUSIONS

Les constituants de poids moléculaire inférieur à $3x10^5$ daltons contenus dans le surnageant de culture de **Salmonella typhimurium** M-206 s'étant révélés particulièrement intéressants pour la vaccination de la souris par voie orale, nous avons entrepris l'isolement et la purification des facteurs immunisants qui s'y trouvent.

En utilisant les techniques d'isoélectrofocalisation préparative soit sur gradient de saccharose, soit sur gel de dextranes, nous avons obtenu une fraction de pH isoélectrique voisin de 10, qui paraît homogène en chromatographie d'exclusion.

Les premiers résultats analytiques permettent de considérer cette dernière comme étant un glycopeptide de poids moléculaire apparent inférieur à 11000.

Administrée à la souris par voie buccale, elle s'est montrée plus efficace que la bactérie vivante correspondante pour protéger l'animal contre une dose d'épreuve de la souche pathogène homologue.

Les possibilités nouvelles offertes par ce type de vaccin sont soulignées en tenant compte des données épidémiologiques récentes concernant les salmonelloses et des avantages que présentent les antigènes purifiés par rapport aux bactéries vivantes ou inactivées.

Le Président de la Thèse :
Professeur A. BERTOYE

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 16 Octobre 1979

Vu, le Directeur de
l'U.E.R. LYON-NORD
Docteur J.P. NEIDHARDT

Le Président de l'Université Claude Bernard
Président du Comité de Coordination
des Etudes Médicales
Professeur D. GERMAIN

BIBLIOGRAPHIE

1 - ACAR (J.F.), HUMBERT (G.) et PISSARO (B.)
Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.
E.M.C., 1970, 8019 A[10].

2 - AIT KHALED (A.), AMRANE (A.), ZIDANE (L.) et BOUAKAZ (R.)
Bilan de l'antibiothérapie de 1664 cas de fièvre typhoïde hospitalisés dans un service du C.H.U. d'El Kettar.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (193-201).

3 - ANDERSON (E.S.)
Drug Resistance in **Salmonella typhimurium** and its Implications.
Brit. Med. J., 1968, **3,** (333-339).

4 - ANDERSON (R.J.), SCHAFFER (L.A.), OLIN (D.B.), EICKHOFF (T.C.)
Septicemia in renal transplant recipients.
Arch. Surg., 1973, **106,** (692-694).

5 - ANDERSON (E.S.) and SMITH (H.R.)
Chloramphenicol resistance in typhoid bacillus.
Brit. Med. J., 1972, **3,** (329-331).

6 - ANTOINE (H.M.) et NICOLLE (R.)
Vaccination T.A.B. dans les Armées. Remise en cause de son caractère obligatoire. Rapport technique présenté au Comité Consultatif de Santé des Armées, 30 novembre 1977.
(Commun. pers.).

7 - ARCHER (J.R.) and ROWLEY (D.)
A quantitative comparison of the antigenic structure of a virulent and an avirulent strain of **Salmonella typhimurium.**
Immunology, 1969, **7,** (551-558).

8 - ARDA (M.)
An experiment on the vaccination of chickens against fowl typhoid with 9 R strain of **Salmonella gallinarum** administered through drinking water (en Turc).
Ankara Univ. Vet. Fak. Derg., 1971, **18,** (229-238).

9 - ARKWIGHT (J.A.)
The value of different kinds of antigens in prophylactic enteric vaccines.
J. Pathol. Bacteriol., 1927, **30,** (345).

10 - ASERKOFF (B.) and BENNETT (J.V.)
Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of **Salmonellae.**
N.E.J. Med., 1969, **281,** (636-640).

11 - ASCHROFT (H.T.), SINGH (B.), NICHOLSON (C.C.), RITCHIE (J.M.), SOBRYAN (E.) and WILLIAMS (F.)
A seven-years field trial of two typhoid vaccines in Guyana.
Lancet, 1967, (1056).

12 - AUBERTIN (J.), GONDAY (G.) et FARRET (O.)
Diarrhées bactériennes aiguës - Physiopathologie et traitement.
Rev. Prat., 1977, **27,** (1901-1915).

13 - AUZINS (I.) and ROWLEY (D.)
Factors involved in the adherence of **Salmonella typhimurium** C-5 and mouse peritoneal macrophage.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1963, **41,** (539-546).

14 - AVRIL (J.L.) et BRIFFOD (J.)
La résistance des **Salmonella** aux antibiotiques.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (172-176).

15 - AVRIL (J.L.), DABERNAT (H.J.), GERBAUD (G.R.), HORODNICEANU (T.), LAMBERT-ZEKOVSKY (N.), LE MINOR (S.), MENDEZ (B.) et CHABBERT (Y.A.)
Groupes d'incompatibilité des plasmides R chez les souches de **Salmonella** épidémiques.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1977, **128 B,** (n° 2), (165-175).

16 - BAINE (W.B.), FARMER (J.J.), GANGAROSA (E.J.), HERMANN (G.T.), THORNSBURRY (C.)
Thyphoid fever in the United States Associated with the 1972-1973 epidemic in Mexico.
J. Infect. Dis., 1977, **135,** (649-653).

17 - BAJOLLE (F.), GERARD (H.), LEFEBVRE (P.)
Aspect épidémiologique des salmonelloses enregistrées dans la région de Reims au cours de l'année 1969 et du premier trimestre 1970.
Ann. Méd. Reims, 1970, **7,** (395-399).

18 - BARDIE (R.), ROLLAND (J.C.), AUDURIER (A.) et GRENIER (B.)
Salmonelloses : étude rétrospective de 136 malades hospitalisés au C.H.U. de Tours.
Sem. Hôp. Paris, 1975, **51,** (581-591).

19 - BARDIE (R.), ROLLAND (J.C.), AUDURIER (A.), GRENIER (B.) et LATRILLE (M.J.)
Sensibilité actuelle des salmonelles aux antibiotiques.
Bordeaux Méd., 1976, **9,** (1665-1670).

20 - BASTIN (R.)
Les fièvres typhoïdes d'aujourd'hui. Leur prévention vaccinale négligée.
Bull. Ac. Nat. Méd., 1978, **161,** (627-632).

21 - BASTIN (R.), CHARMOT (G.) et FROTTIER (T.)
Fièvre typhoïde des touristes et vaccination.
Rev. Prat., 1979, **29,** (2179-2180).

22 - BASTIN (R.) et DUPONT (B.)
Porteurs de salmonelles.
Rev. Prat., 1972, **22,** (3713-3724).

23 - BENENSON (A.S.)
Serological responses of man to typhoid vaccines.
Bull. Org. Mond. Santé, 1964, **30,** (653).

24 - BERNARD (J.G.), BONNET (D.), CALVET (G.), LAVERDANT (C.)
Considérations épidémiologiques, cliniques et prophylactiques sur les fièvres typho-paratyphoïdiques en milieu vacciné (à propos de 1078 cas).
Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris, 1960, **76,** (1185).

25 - BERNARDI (G.)
Methods in Enzymology.
Acad. Press. N.Y., 1971, **22,** (325).

26 - BERRY (L.J.), DOUGLAS (G.N.), HOOPS (P.), PRATHER (N.E.)
The background of immunization against salmonellosis.
Proc. Fourth. Int. Convocation Immunol. (Karger, Basel), 1975, (388-398).

27 - BERTRAND (J.L.)
Infections à salmonelles.
Concours Méd., 1974, **96,** (2813-2825).

28 - BERTRAND (J.L.), BRUNEL (D.), CRET (J.) et BERTOYE (A.)
Les manifestations extra-digestives des salmonelloses.
Lyon Méd., 1971, **225,** (n° spécial), (39-47).

29 - BERTRAND (J.L.) et GUETTA (R.)
Traitement des salmonelloses «non typhoïdiques».
Cah. Méd., 1979, **5,** (n° 1), (34-36).

30 - BESREDKA (A.)
De la vaccination contre les états typhoïdiques par la voie buccale.
Ann. Inst. Pasteur, 1919, **33,** (882).

31 - BESREDKA (A.)
L'expérience de la Flèche. A propos de la vaccination antityphique.
C.R. Soc. Biol., 1923, (366).

32 - BLACK (P.H.), KUNZ (L.J.) and SWARTZ (M.N.)
Salmonellosis. A review of some unusual aspects.
New Engl. J. Med., 1960, **26,** (811-817), (864-870), (921-927).

33 - BORGONO (J.M.), COREY (G.) and ENGELHARDT (H.)
Field trials with killed oral typhoid vaccines.
Develop. Biol. Standard, 1975, **33,** (80).

34 - BORGONO (J.M.), GREIBER (R.), BAGUENADO (F.), CAURILLO (B.), CONCHA (F.) e SOLANI (G.)
Vacunation antitifica oral. Resultatos preliminare.
Rev. Méd. Chile, 1972, **100,** (1129).

35 - BOSCHETTI (E.), TIXIER (R.), URIEL (J.)
Biochimie, 1972, **54,** (439-444).

36 - BOUANCHAUD (D.H.) and CHABBERT (Y.A.)
Stable coexistence of three resistance factors (fi⁻) in **Salmonella panama** and **Escherichia coli** K 12.
J. Gen. Microbiol., 1969, **58,** (107-113).

37 - BOUVET (A.), DUBOUST (A.), ACAR (J.F.) et BARIETY (J.)
Infections à salmonelles chez les transplantés rénaux.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (223-227).

38 - BRISOU (R.), BOUDON (A.) et MENARD (J.C.)
Salmonella wien dans la région toulonnaise.
Méd. Mal. Infect., 1972, **11,** (173-180).

39 - BRISOU (B.), CASANO (P.), CHAMFEUIL (R.) et BOUDON (A.)
Les salmonelloses humaines d'origine carnée : réflexions épidémiologiques à propos d'une enquête bactériologique dans les boucheries d'une grande ville.
Rev. Epidém., Méd. Soc. et Santé Publ., 1975, **23,** (n° 7-8), (445-461).

40 - BRISOU (B.), CHAMFEUIL (R.) et PHOLOPPE (P.E.)
L'isolement des salmonelles.
Médecine et Armées, 1975, **3,** (n° 2), (165-168).

41 - BRISOU (B.), PHOLOPPE (P.E.) et BOUDON (A.)
Salmonelles et personnels de l'alimentation. A propos de 1137 coprocultures.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (214-218).

42 - BRUNEL (D.) et ASTRUC (J.)
Les salmonelloses digestives du premier âge. Epidémiologie. Prophylaxie. Traitement.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (177-185).

43 - BRUNOT (J.)
Contribution à l'étude de l'antigène vaccinant des salmonelles.
Thèse Médecine, Lyon, 1977, n° 503.

44 - BURDIN (J.L.), DUREUX (J.B.) et CANTON (P.)
Généralités sur les salmonelloses.
E.M.C., Maladies Infectieuses, 1975, 8018 A^{10}.

45 - BUTLER (T.), LINH (N.N.), ARNOLD (K.) and POLLACK (M.)
Chloramphenicol resistant typhoid fever in Vietnam associated with R factor.
Lancet, 1973, (983-985).

46 - CARBONELLE (B.), VIEU (J.F.), TOUCAS (M.) et PARNERY (F.)
Analyse d'une infection collective à **Salmonella typhimurium** d'origine alimentaire.
Méd. Mal. Infect., 1972, **2,** (79-86).

47 - CAREY (W.F.) and BARON (L.S.)
Comparative immunologic studies of cell structures isolated from **Salmonella typhi.**
Bactériol. Proc., 1958, **1,** (74).

48 - CASTEIGNE (P.), CAMBIER (J.), SCHULLER (G.)
Dosage des protéines totales et de certaines globulines du liquide céphalo-rachidien : application de l'analyse automatique aux techniques de fractionnement chimique. I - Dosage des protéines totales du liquide céphalo-rachidien.
Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., 1965, **10,** (529-533).

49 - CATSARAS (M.), SEYNAVE (R.) et SERY (C.)
Salmonella dans les boucheries. III-Contamination des boucheries de cheval.
Bull. Acad. Vétér., F2, 1975, **47,** (n° 8-9), (399-404).

50 - CAZAURAN (J.P.), FONTAN (D.). MICHEAU (M.), GUILLARD (J.M.) et VERGER (P.)
Les salmonelloses digestives de l'enfant.
Bordeaux Méd., 1976, **9,** (1671-1676).

51 - CHABBERT (Y.A.)
Résistance des salmonelles aux antibiotiques.
G.M. de France, 1975, **82,** (n° 15), (1767-1772).

52 - CHABBERT (Y.A.) and BAUDENS (J.B.)
Transmissible resistance to six groups of antibiotics in **Salmonella** infections.
Antimicrob. Agents Chemother., 1965, ASM, (380-383).

53 - CHABBERT (Y.A.) et GERBAUD (G.R.)
Surveillance épidémiologique des plasmides responsables de la résistance au chloramphénicol de **Salmonella typhi.**
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1974, **125 A,** (153-166).

54 - CHABBERT (Y.A.) et LE MINOR (L.)
Transmission de la résistance à plusieurs antibiotiques chez les entéro-bacteriaceae. II - Bactériologie générale de la résistance.
Presse Médicale, 1966, **74,** (2479-2484).

55 - CHABBERT (Y.A.), SCAVIZZI (H.R.), WITCHITZ (J.L.), GERBAUD (G.R.) and BOUANCHAUD (D.H.)
Incompatibility groups and the classification of fi – resistance factors.
J. Bact., 1972, **112,** (666-675).

56 - CHARMOT (G.) et BRUMPT (I.)
Les salmonelloses non typhoïdiques.
Rev. Prat., 1979, **29,** (2217-2227).

57 - CHASSEUR-LIBOTTE (M.L.), GHYSELS (G.), POHL (P.) et VAN OYE (E.)
Salmonella wien en Belgique.
Méd. Mal. Infect., 1977, **7,** (265-269).

58 - CHERUBIN (C.E.) and FODOR (T.)
The Epidemiology of salmonellosis in New York city.
Amer. J. Epidem., 1969, **9,** (122-125).

59 - CHERUBIN (C.E.), FODOR (T.), DENMARK (L.I.), MASTER (C.S.), FUERST (H.T.) and WINTER (J.W.)
Symptoms, septicemia and death in salmonellosis.
Ann. J. Epidemiology, 1969, **90,** (285-291).

60 - CHERUBIN (C.E.), NEU (C.), IMPERATO (P.J.), HARVEY (R.P.) and BELLE (N.)
Septicemia with non-typhoidic **Salmonella.**
Medicine, 1974, **53,** (365-376).

61 - CHERUBIN (C.E.), NEU (C.H.), RABAL (J.J.) and SABATH (L.D.)
Emergence of Resistance to chloramphenicol in **Salmonella.**
J. Infect. Dis., 1977, **135,** (807-812).

62 - CHUTTANI (C.S.)
Controlled field trials of three different oral killed typhoid vaccines in India.
Develop. Biol. Standard., 1975, **33,** (98).

63 - CHUTTANI (C.S.), PRAKASH (K.), VERGESE (A.), GUPTA (P.), CHAWLA (R.K.), GROWER (N.) and AGARWAL (D.S.)
Ineffectiveness of an oral killed typhoid vaccine in a field trial.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1973, **48,** (756).

64 - CHUTTANI (C.S.), PRAKASH (K.), VERGESE (A.), STIARMA (U.), SINGHA (P.) and GHOSH RAY (B.)
Effectiveness of oral killed typhoid vaccine.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1971, **45,** (445).

65 - CIRODDE (M.)
Contributions à l'étude des propriétés bactériolytiques du sérum au cours de la vaccination contre les salmonelloses.
Thèse Médecine Lyon, 1963.

66 - CLEMENTI (K.J.)
Treatment of **Salmonella** carriers with trimethoprim-sulfamethoxazole.
C.M.A. Journal, 1975, **112,** (Special issue 13), (28-32).

67 - COCKBURN (V.C.)
Large-scale field trials of active immunizing agents, with special reference to vaccination against **Pertussis.**
Bull. Org. Mond. Santé, 1955, **13,** (395-407).

68 - COLLINS (F.M.)
Immunogenicity of living and heat-killed **Salmonella pullorum** vaccines.
Infect. Immun., 1973, **7,** (735).

69 - COLLINS (F.M.) and CARTER (P.B.)
Comparative immunogenicity of heat-killed and living oral **Salmonella** vaccines.
Infect. Immun., 1972, **6,** (451).

70 - COLLINS (F.M.) and MILNE (M.)
Heat labile antigens of **Salmonella enteritidis.** I - Extraction of antigens.
J. Bacteriol., 1966, **92,** (543-548).

71 - COLLINS (F.M.) and MILNE (M.)
Heat labile antigens of **Salmonella enteritidis.** II - Mouse protection studies.
J. Bacteriol., 1966, **92,** (549-557).

72 - COLOBERT (L.)
Peut-on améliorer les techniques actuelles de vaccination contre les salmonelloses ?
Ann. Hyg. Lang. Fr., 1965, **n° 2,** (25-31).

73 - COSTA (M.), TIMPANO (C.) et ANDIZEI (G.)
Correletta therapeutica in 146 casi di salmonellosi non tyfoparatifiche asservati nel periodo 1 Gennaro 1974, 31 Maggia 1976.
Giorn. Mal. Infect. Paras., 1977, **29,** (229-232).

74 - CREACH (O.), ARMINJON (F.), LAVAL (F.), BRUNOT (J.) et FONTANGES (R.)
Purification de l'antigène vaccinant contenu dans le surnageant de culture de **Salmonella typhimurium** (souche M-206).
C.R. Travaux Scientifiques CRSSA, 1977, **7,** (273-277).

75 - CREACH (O.), DELORD (G.), POULET (M.) et FONTANGES (R.)
Purification de l'antigène vaccinant contenu dans le surnageant de culture de **Salmonella typhimurium.**
C.R. Travaux Scientifiques CRSSA, 1978, **8,** (262-264).

76 - CREACH (O.), IVANOFF (B.), BIENVENU (P.), DOMBRIS (A.) et FONTANGES (R.)
Etude de l'antigène vaccinant isolé à partir du surnageant de culture de **Salmonella typhimurium.**
C.R. Travaux Scientifiques CRSSA, 1976, **6,** (160-162).

77 - CREACH (O.), RICHARD (M.), PORTALIER (R.), FOURNIER (J.M.) et FONTANGES (R.)
Isolement et caractérisation d'un antigène vaccinant présent dans le surnageant de culture de **Yersinia pestis** (souche EV-40).
C.R. Acad. Sci., 1973, **276 D,** (2919-2922).

78 - CRONLY-DILLON (S.)
Studies on infection and immunity in experimental mouse typhoid.
M. Sc. Thesis University of Edinburgh, 1967.

79 - CRONLY-DILLON (S.)
The relative potencies of heat-killed and acetone-killed vaccines against **Salmonella typhimurium** in mice.
J. Hyg., 1972, **70,** (597-603).

80 - CVJETANOVIC (B.)
Field trial on typhoid vaccines.
Amer. J. Publ. Health., 1957, **47,** (578).

81 - CVJETANOVIC (B.)
Controlled field trials of prophylactis (with special reference to typhoid vaccines).
J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 1961, **5,** (7).

82 - CVJETANOVIC (B.), MEL (D.M.) and FELSENFELD (D.)
Study of live typhoid vaccine in chimpanzees.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1970, **42,** (499).

83 - CVJETANOVIC (B.) and UEMURA (K.)
The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vacciner.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1965, **32,** (29).

84 - DIENA (B.B.), BARON (L.S.), JOHNSON (E.M.), WALLACE (R.) and ASHTON (F.E.)
Role of typhoid antigens in protection and pathogenicity for mice.
Infect. Immun., 1974, **9,** (1102-1104).

85 - DIENA (B.B.), RYAN (A.), WALLACE (R.), ASHTON (F.E.), JOHNSON (E.M.), BARON (L.S.)
Ineffectiveness of Vi and chemically treated endotoxins as typhoid vaccines in mice challenged with a **Salmonella typhosa - Salmonella typhimurium** hybrid.
Infect. Immun., 1975, **12,** (1470-1471).

86 - DIENA (B.B.), RYAN (A.), WALLACE (R.), JOHNSON (E.M.), BARON (L.S.) and ASTHON (F.E.)
Effectiveness of parenteral and oral typhoid vaccination in mice challenged with a **Salmonella typhi - Salmonella typhimurium** hybrid.
Infect. Immun., 1977, **15,** (997-998).

87 - DINBAR (A.), ALTMAN (N.), TULCINSKY (D.B.)
The treatment of chronic biliary **Salmonella** carriers.
Ann. J. of Med., 1969, **47,** (236-242).

88 - DIXON (J.M.S.)
Effect of antibiotic treatment on duration of excretion of **Salmonella typhimurium** by children.
Brit. Med. J., 1965, **2,** (1343-1345).

89 - DOMART (A.), ROBINEAU (M.), STROM (A.), DUBERTRET (L.), MONSALLIER (J.F.) et MODAI (J.)
Septicémie à **Salmonella wien.** Problèmes diagnostiques, thérapeutiques et épidémiologiques.
Ann. Méd. Interne, 1974, **125,** (915-918).

90 - DUPONT (H.L.), HORNICK (R.B.), SNYDER (M.J.), DAWKINS (A.T.), HEINER (G.G.) and WOODWARD (T.E.)
Studies of immunity in typhoid fever. Protection induced by killed oral antigens or by primary infection.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1971, **44,** (667).

91 - DUPUIS (F.), VEREERSTRAETEN (P.), VAN GEERTRUYDEN (J.), KINNAERT (P.), SCHOUTENS (E.), TOUSSAINT (C.)
Salmonella typhimurium urinary infection after kidney transplantation. Report of seven cases.
Clin. Nephrol., 1974, **2,** (131-135).

92 - DUSSOURD D'HINTERLAND (L.), MICHEL (F.B.), NORMIER (G.), PINEL (A.M.)
Les vaccins ribosomaux.
Rev. franç. Allergol., 1977, **17,** (n° 4 B), (9-14).

93 - EDSALL (G.), CARLSON (M.C.), FORMAL (S.B.) and BENENSON (A.S.)
Laboratory tests of typhoid vaccines used in a controlled field study.
Bull. Org. Mond. Santé, 1959, **20,** (1017).

94 - EISENSTEIN (T.K.)
Evidence for O antigens as the antigenic determinant in «ribosomal» vaccines prepared from **Salmonella.**
Infect. Immun., 1975, **12,** (364-377).

95 - ELKINA (S.I.), SERGEEV (W.W.), SHUSTER (B.J.U.), LIKHODED (V.G.)
Propriétés virulentes et immunogènes du mutant streptomycino- et guanidino-dépendant de **S. typhimurium** (en russe).
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1971, **48,** (n° 1), (10).

96 - ESTAVOYER (J.M.), LETZLER (R.), DUPONT (M.J.), MICHEL-BRIAND (Y.), BAUFLE (G.M.) et RAFFI (A.)
Salmonelloses ubiquitaires en milieu hospitalier pédiatrique (à propos de 261 observations).
Rev. Fr. Gastro-Entérol., 1977, **130,** (15-28).

97 - ETOUNDI ESSOMBA MANY
Les **Salmonella** isolées au Cameroun à l'Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des plantes médicinales.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (202-203).

98 - FABIANI (G.), CARTIER (F.), LAUNOIS (B.) et CORMIER (M.)
Salmonellose et transplantation rénale.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (219-222).

99 - FALKOW (S.)
Infections multiple drug resistance.
Pion London Edit., 1975.

100 - FASQUELLE (R.), LE MINOR (L.) et BOURDON (J.L.)
Les salmonelloses.
Rev. Prat., 1961, **11,** (n° 18), (1853-1868).

101 - FERRABOUC (L.) et BERNARD (J.G.)
A propos d'une épidémie de fièvre typhoïde chez les vaccinés.
Bull. Men. Soc. Méd. Hôp. Paris, 1956, **21,** (639-641).

102 - FISKE (C.H.) et SUBBAROW (Y.)
J. Biol. Chem., 1925, **66,** (375-400).

103 - FONTANGES (R.), IVANOFF (B.) and CREACH (O.)
Compared efficiency of a killed vaccine of **Salmonella typhimurium** a live vaccine and an antigenic fraction in oral immunization of mice.
Progr. Immunobiol. Stand., 1976, **33,** (118-123).

104 - FOURNIER (J.M.), CREACH (O.), CHABOUD (J.J.), DODIN (A.) et FONTANGES (R.)
Etude sur la souris du pouvoir protecteur de la souche EV de **Yersinia pestis** et de son surnageant de culture.
C.R. Acad. Sci., 1972, **275 D,** (3057-3059).

105 - FOX (M.D.)
Recent trends in salmonellosis epidemiology.
J. Amer. Vet. Med. Ass., 1974, **165,** (990-993).

106 - GAINES (S.), LANDY (M.), EDSALL (G.), MANDEL (A.D.), TRAPANI (R.J.), BENENSON (A.S.)
Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. III - Effectif of prophylactic immunization.
J. Exper. Med., 1961, **114,** (327).

107 - De GALBERT (M.A.)
Etude analytique des salmonelloses hospitalières au C.H.U. de Grenoble de 1974 à 1976 (à propos de 213 observations).
Thèse Médecine Grenoble, juin 1977.

108 - GANGAROSA (E.J.), BENNETT (J.V.), WYATT (C.), PIERCE (P.E.), OLARTE (J.), MENDOZA HERNANDEZ (P.), VASQUEZ (V.) and BESSUDO (D.M.)
From the center for disease control. An epidemic-associated episome ?
J. Infect. Dis., 1972, **126** (215-218).

109 - GERMANIER (R.)
Immunity in experimental salmonellosis. III– Comparative immunization with viable and heat inactived cells of **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1972, **5,** (792-797).

110 - GIANELLA (R.A.), FORMAL (S.B.), DAMMIN (G.J.) and COLLINS (H.)
Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion and reaction in the rabbit ileus.
J. Clin. Invest., 1973, **52,** (441-453).

111 - GILMAN (R.H.), HORNICK (R.B.), WOODWARD (W.E.), DUPONT (H.L.), SNYDER (M.J.) LEVINE (M.M.) and LIBONATI (J.P.)
Evaluation of a U.D.P.-Glucose-4-Epimeraseless Mutant of **Salmonella typhi** as a live oral vaccine.
J. Infect. Dis., 1977, **136,** (717-723).

112 - GLEDEL (J.), PANTALEON (J.) et CORBION (B.)
Etude de l'antibiorésistance de 3600 souches de **Salmonella** d'origine animale (1974-1975).
Rev. Méd. Vét., 1977, **153,** (109-118).

113 - GORZYNSKI (E.A.) and KRASNY (S.A.)
Effect of erythrocytes treated with enterobacterial common antigen on experimental **Salmonella typhimurium** infection of mice.
Med. Microbiol. Immuno., 1975, **161,** (163-170).

114 - GORZYNSKI (E.A.), PRIORE (R.L.) and NETER (E.)
Effect of immunization with common enterobacterial antigen on experimental **Salmonella typhimurium** infection of mice.
Immun. Commun., 1972, **1,** (123-130).

115 - GOUT (J.P.), LE NOC (P.), BOST (M.) et MICOUD (M.)
Importance des formes dites mineures dans le recrutement des salmonelloses du C.H.U. de Grenoble. A propos de 300 cas de 1974 à 1977.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (204-213).

116 - GRAHNEIS (H.)
Effectiveness of oral inactivated typhoid vaccine.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, **21,** (75).

117 - GRANT (R.B.), BANNATYNE (R.M.) and SHAPLEY (A.J.)
Resistance to chloramphenicol and ampicilline of **Salmonella typhimurium** in Ontario, Canada.
J. Infect. Dis., 1976, **134,** (354-361).

118 - GRANT (R.B.) and DI MANBRO (L.)
Antimicrobial resistance and resistance plasmids in **Salmonella** from Ontario (Canada).
Can. J. Microbiol., 1977, **23,** (1266-1273).

119 - GUIBERT (J.M.C.)
Epidémie à **Salmonella wien.**
E.M.C., Maladies Infectieuses, 1973, 8018 A[10].

120 - HAN (T.), SOKAL (J.E.), NETTER (E.)
Salmonellosis in disseminated malignant disease.
New Engl. J. Med., 1967, **276,** (1045-1052).

121 - HEJFEC (L.B.)
Results of the study of typhoid vaccines in four controled fields trials in the URSS.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1965, **32,** (1).

122 - HEJFEC (L.B.), LEVINA (L.A.), SALMIN (L.B.), ANTONOVA (A.A.), SEGAL (L.S.), KURZMINOVA (H.L.), SLAVINA (K.M.) and VASILEVA (A.V.)
Controlled field trials of killed oral typhoid and paratyphoid B vaccines and cell-free, chemical aerosol typhoid vaccine.
Develop. Biol. Standard, 1975, **33,** (93).

123 - HOFFMANN (K.)
Traitement par le lactulose des porteurs sains de salmonelles dans les selles.
Dent. Med. Wochenschr., 1975, **100,** (1429).

124 - HOOK (E.W.)
Salmonella infection other than typhoid fever. In Texbook of medicine.
14e Ed. SAUNDERS. Philadelphia, 1975, 1 vol., (364-367).

125 - HOOPS (P.), PRATHER (N.E.), BERRY (L.J.), RAVEL (J.M.)
Evidence for an extrinsic immunogen in effective ribosomal vaccines from **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1976, **13,** (1184).

126 - HORNICK (R.B.), DUPONT (H.L.), DAWKINS (A.T.), SNYDER (M.J.) and WOODWARD (T.E.)
Evaluation of typhoid vaccines in man.
Progr. Immunobiol. Standard, 1971, **15,** (143-150).

127 - HORNICK (R.B.), DUPONT (H.L.), LEVINE (M.M.), GILMAN (R.H.), WOODWARD (W.E.), SNYDER (M.J.) and WOODWARD (T.E.)
Efficacity of a live oral typhoid vaccine in human volunteers.
Develop. Biol. Standard, 1975, **33,** (89).

128 - HORNICK (R.B.), GREISMANN (S.A.), WOODWARD (T.E.), DUPONT (H.L.), DAWKINS (A.T.) and SNYDER (M.J.)
Typhoid fever-pathogenesis and immunologic control.
New Engl. J. Med., 1970, **283,** (686-691), (739-745).

129 - HOUCHENS (D.P.), WRIGHT (G.I. Jr)
Immunity to **Salmonella typhimurium** infection characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis.
Infect. Immun., 1973, **7,** (507-511).

130 - IVANOFF (B.)
Evolution des immunoglobulines intestinales et sériques de la souris au cours de la vaccination par voie orale.
Thèse de doctorat d'Etat en Pharmacie, Lyon, 1976.

131 - IVANOFF (B.), CREACH (O.), DELORME (P.), LAVAL (F.) et FONTANGES (R.)
Mise en évidence d'un antigène vaccinant dans le surnageant de culture de **Salmonella typhimurium** M-206.
C.R. Travaux Scientifiques CRSSA, 1974, **4,** (144-145).

132 - IVANOFF (B.), CREACH (O.), DELORME (P.), LAVAL (F.) et FONTANGES (R.)
Mise en évidence d'un antigène vaccinant dans le surnageant de culture de **Salmonella typhimurium** M-206.
C.R. Acad. Sc. Paris, série D., 1975, **280,** (791-793).

133 - IVANOFF (B.), CREACH (O.) et FONTANGES (R.)
Etude de la protection de la souris après vaccination par voie orale à l'aide d'une souche pathogène tuée de **Salmonella typhimurium.**
C.R. Soc. Biol., 1974, **168,** (541-545).

134 - IVANOFF (B.), CREACH (O.) et FONTANGES (R.)
Aspect actuel de la vaccination par voie orale contre les entérobactéries. Technologie et résultats.
Lyon Pharmaceutique, 1975, **26,** (243-254).

135 - IVANOFF (B.), LAVAL (F.), CREACH (O.) et FONTANGES (R.)
Etude de la protection de la souris après vaccination par voie orale à l'aide d'une souche avirulente vivante de **Salmonella typhimurium.**
C.R. Soc. Biol., 1975, **169,** (350-354).

136 - IVANOFF (B.), LAVAL (F.), CREACH (O.) et FONTANGES (R.)
Evolution des immunoglobulines intestinales et sériques de la souris après vaccination par voie orale.
C.R. Soc. Biol., 1977, **171,** (n° 2), (380).

137 - JANBON (F.)
Les salmonelloses non typhoïdiques de l'adulte.
Méd. Mal. Infect., 1978, **6,** (270).

138 - JANBON (M.), BERTRAND (A.), BRUNEL (D.) et MICHEL (F.)
Sur l'antibiothérapie de la fièvre typhoïde. Commentaires de 90 cas traités par le thiamphénicol.
Press. Méd., 1966, **74,** (151-156).

139 - JENKIN (C.R.) and ROWLEY (D.)
Partial purification of the «protective» antigen of **Salmonella typhimurium** and its distribution among various strains of bacteria.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1965, **43,** (65-78).

140 - JOHNSON (W.)
Ribosomal vaccines. I - Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from **Salmonella typhimurium** and **Yersinia pestis.**
Infect. Immun., 1972, **5,** (947-952).

141 - JOHNSON (W.)
Ribosomal vaccines. II-Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic acid and protein isolated from **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1973, **8,** (395-399).

142 - JOYEUX (Y.), JOUIN (H.), LELUC (B.) et STAUB (A.M.)
Recherches sur l'antigène X responsable de la production des anticorps anti-**Salmonella typhi,** protecteurs pour l'embryon de poulet.
C.R. Acad. Sci. (Paris), série D, 1974, **279,** (1507-1510).

143 - JOYEUX (Y.), JOUIN (H.), LELUC (B.) et STAUB (A.M.)
Recherche sur l'antigène X responsable de la production des anticorps anti-**Salmonella typhi,** protecteurs pour l'embryon de poulet.
Ann. Immunobiol. (Inst. Pasteur), 1977, **128 C,** (221-223).

144 - KAWAKAMI (M.)
Immunizing effect of the live vaccine and the surface materials obtained from various mutants of **Salmonella.** In colloque intern. CNRS n° 174 «La structure et les effets biologiques des produits bactériens provenant des germes Gram-négatifs».
CNRS édit., 1969, (255-268).

145 - KAWAKAMI (M.), OSAWA (N.) and MITSUHASHI (S.)
Experimental salmonellosis. VII-Comparison of the immunizing effect of live vaccine and materials extracted from **Salmonella typhimurium.**
J. Bacteriol., 1966, **92,** (1585).

146 - KAZEMI (M.), GUMPERT (G.) and MARKS (M.I.)
A controlled trial comparing sulfamethoxazole-trimethoprim, ampicillin and no therapy in the treatment of **Salmonella** gastro-enteritidis in children.
J. Pediatr., 1973, **83,** (646-650).

147 - KAZEMI (M.), GUMPERT (G.) and MARKS (M.I.)
Clinical spectrum and carrier state of non typhoidal **Salmonella** infections in infants and children.
The Canadian Med. Ass. J., 1974, **110,** (n° 11), (1253-1259).

148 - KHEIFETS (L.B.), LEVINA (L.A.), BENTSIONOVA (T.G.), SALMIN (L.V.)
Activité protectrice de différents complexes antigéniques des vaccins antityphoïdiques et recherches sur l'amélioration des vaccins chimiques (en russe).
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1970, **47,** (n° 5), (89).

149 - KOBAYASHI (R.) and USHIBA (D.)
Studies on the immunity of the experimental typhoid. I. - A review of experiments carried out in our laboratory during the past twenty years.
Keio. J. Med., 1952, **1,** (53).

150 - KONELNY (A.W.) et ROLLI (R.)
Epidemiologica delle gastroenteriti nel adulta.
Giorn. Mal. Infect. Paras., 1975, **27,** (861-867).

151 - KRUBWA (F.), GATTI (E.), VAN OYE (E.), GHYSELS (G.), ROBINET (R.), MAES (L.), LANDUYT (H.) et VAN DE PITTE (J.)
Salmonella isangi. Sa place dans l'épidémiologie des salmonelloses humaines à Kinshasa de 1969 à 1973.
Ann. Soc. belge Méd. Trop., 1976, **56,** (11-24).

152 - LABEGORE (J.), THEVENEAU (J.T.), CLUZET (C.)
Aspects particuliers des septicémies salmonelliennes au Gabon. Rôle prédominant de **Salmonella typhimurium.**
Méd. Trop., 1973, **33,** (465-469).

153 - LACUT (J.Y.), RINDEL (D.), DURAND (M.), ISSANCHOU (A.M.), MERLET (M.), LEGENDRE (P.), LENG (B.) et AUBERTIN (J.)
Salmonelloses et cancer. A propos de 8 observations personnelles.
Bordeaux Médical, 1976, **8,** (1687-1694).

154 - LAFAIX (C.), CAMERLYNCK (P.) et REY (M.)
Endémie dakaroise et épidémie hospitalière à souches polyrésistantes de **S. stanleyville.**
Bull. Soc. Méd. Afr. Noire Lgue Fr., 1968, **13,** (225-233).

155 - LAPLANE (R.), BEGUE (P.), OMANGA (U.) et RIZO (G.)
Incidence actuelle des salmonelloses intestinales dans un hôpital pédiatrique parisien.
Bull. Acad. Nat. Méd., 1974, **158,** (238).

156 - LAMBIN (P.)
Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate.
Anal. Biochem., 1978, **85,** (114-125).

157 - LASFARGUES (G.), Mme CATHELINEAU, Mme STEINBERG, POLONOVSKI (C.), LAPLANE (R.)
Salmonelloses digestives du nourrisson.
Rev. Prat., 1969, **19,** (3871-3876).

158 - LEGENDRE (P.), GRANGE (J.), MERLET (M.), ISSANCHOU (A.M.), LACUT (J.Y.), LENG (B.), AUBERTIN (J.)
Répartition actuelle des salmonelloses en Gironde.
Bordeaux Médical, 1976, **9,** (1649-1652).

159 - LEMIERE (A.)
A propos de la vaccination antityphique.
Pr. Méd., 2 mars 1932, (329).

160 - LE MINOR (L.)
Problème national des salmonelloses.
Gaz. Méd. Fr., 1975, **82,** (1735-1736).

161 - LE MINOR (S.)
Apparition en France d'une épidémie à **Salmonella wien.**
Méd. Mal. Infect., 1972, **2,** (441-448).

162 - LE MINOR (L.) et LE MINOR (S.)
Bilan de l'origine et de la répartition des **Salmonella** reçues au Centre National des **Salmonella** pendant les années 1967 à 1969.
Rev. Epidém. Méd. Soc. Santé Publ., 1971, **19,** (19-66).

163 - LE MINOR (S.) et LE MINOR (L.)
Bilan de l'origine et de la répartition des salmonelles reçues au Centre National des **Salmonella** pendant les années 1970 à 1972. (7e Rapport d'activité).
Rev. Epidém. Méd. Soc. Santé Publ., 1973, **21,** (665-722).

164 - LE MINOR (L.) et LE MINOR (S.)
Bilan de l'origine et de la répartition des salmonelles reçues au Centre National des **Salmonella** les années 1973 à 1976.
Rev. Epidém. Méd. Soc. Santé Public., 1978,

165 - LETONTURIER (P.), CALAMY (G.), ROBINEAU (M.), MODAI (J.), BASTIN (R.) et DOMART (A.)
La fièvre typhoïde (à propos d'une récente série de 100 observations).
Lyon Méd., 1971, **225,** (85-98).

166 - LEVINE (M.M.), DUPONT (H.L.), HORNICK (R.B.), SNYDER (M.J.), WOODWARD (W.E.), GILMAN (R.H.) and LIBONATI (J.P.)
Attenuated, streptomycino-dependant **Salmonella typhi** oral vaccine : potential deleterious effects of lyophilization.
J. Infect. Dis., 1976, **133,** (424).

167 - LIN (J.H.) and BERRY (L.J.)
The use of strain LT2-M1 in identifying the prospective antigens in a **Salmonella typhimurium** derived ribosomal vaccine.
Res. J. Reticuloendothel. Soc., 1978, **23,** (135-143).

168 - LINDE (K.), KOKH (K.H.), KITLIK (M.), SCHMIDT (S.), KEDITTS (K.)
Vaccination orale par des entérobactéries atténuées. II. - Le problème génétique de l'isolement des souches vivantes atténuées «stables» pour l'immunisation (en russe).
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1972, **49,** (n° 3), (67).

169 - LIPSON (A.)
Infective dose of **Salmonella.**
Lancet, 1976, **1,** (969).

170 - LIPSON (A.)
Small infective dose of **Salmonella.**
Lancet, 1976, **1,** (1130 - lettre).

171 - LUMIERE (A.) et CHEVROTIER (J.)
Sur la vaccination antityphique par voie gastro-intestinale.
C.R. Acad. Sci., 1914, **158,** (197).

172 - Mac LEOD (D.R.E.)
Immunity to **Salmonella** infection in mice.
J. Hyg., 1954, **52,** (9).

173 - MANDAL (B.K.) and MANI (V.)
Colonie involvement in salmonellosis.
Lancet, 1965, **1,** (887-888).

174 - MANTEN (A.), GUINEE (P.A.M.), KAMPELACHER (E.M.) and VOOGD (C.E.)
An eleven years study of drug resistance in **Salmonella** in the Netherlands.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1971, **45,** (85).

175 - MARGOLIS (J.M.), BIGLEY (N.J.)
Cytophilic macroglobulin reactive with bacterial protein in mice immunized with ribonucleic acid-protein fractions of virulent **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1972, **6,** (390-397).

176 - MARINOVA (S.), MANOLOV (D.)
Etude de la stabilité des mutants de salmonelles streptomycino-résistantes avec une virulence atténuée (en bulgare).
Epidémiol. Mikrobiol. Infekt. Bolesti., 1973, **10,** (245).

177 - MARMION (D.E.), NAYLOR (G.R.), STEWARD (I.O.)
Second attacks of typhoid fever.
J. Hyg., 1953, **51,** (260-267).

178 - MAURER (H.R.)
Disc-electrophoresis and releated technics of polyacrylamide gel electrophoresis.
Walter de GRUYTER, Berlin, 1971.

179 - MERED (B.), BEN HASSINE (M.), PAPA (F.), KHATI (B.), KHEDDARI (M.), RAHAL (A.) et SARI (L.)
Epidémie à **Salmonella wien** et à **Salmonella typhimurium** dans un service de pédiatrie. Etude bactériologique et épidémiologique.
Arch. Inst. Pasteur Algérie, 1970, **48,** (41-52).

180 - MERLET (M.), LEGENDRE (P.), ISSANCHOU (A.M.), LACUT (J.Y.), LENG (B.) et AUBERTIN (J.)
Aspects cliniques actuels des salmonelloses de l'adulte.
Bordeaux Médical, 1976, **9,** (1653-1658).

181 - MISFELD (M.L.) and JOHNSON (W.)
Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fractions from **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1978, **24,** (808-816).

182 - MIZON (F.) et LECLERC (H.)
Les plasmides de résistance aux antibiotiques chez les **Salmonella** ; étude écologique et intérêt épidémiologique à propos du modèle : **Salmonella panama.**
Rev. Epidém., Méd. Soc. et Santé Publ., 1975, **23,** (n° 6), (321-343).

183 - MODAI (J.), GHANASSIA (J.P.), DE VIGAN (C.) et DOMART (A.)
Septicémies à salmonelles non typhoïdiques.
Ann. Méd. Int., 1977, **128,** (263-268).

184 - MOLINARI (J.L.), CABRERA (R.)
Immunidad inducida con una preparacion ribosomale obtenida de **Salmonella typhi** Ty 2.
Rev. Latino-amer. Microbiol., 1974, **16,** (199).

185 - MOLINARI (J.L.), FLISSER (A.), CABRERA (R.)
Immunidad inducida con fraccion ribosomale obtenida de **Salmonella typhi** Ty 2 contra diversas cepas de **S. typhi.**
Rev. Latino-amer. Microbiol., 1975, **17,** (149).

186 - MOLINARI (J.L.), LARRALDE (C.)
Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with fractions of **Salmonella typhimurium.**
Rev. Latino-amer. Microbiol., 1974, **16,** (189).

187 - MONNET (P.)
Etat actuel et tendances concernant la vaccination anti-typho-paratyphoïdique.
Lyon Méd., 1978, **240,** (n° 13), (31-36).

188 - MOORE (S.), STEIN (W.)
Chromatographic determination of amino-acids by the use of automatic recording equipment.
Methods in Enzymology, Academic Press, N. Y., 1963, **6,** (819-831).

189 - MUSSCHE (M.M.), LAMEIRE (N.H.), RINGOIR (S.M.G.)
Salmonella typhimurium infections in renal transplant patients.
Nephron., 1975, **15,** (143-150).

190 - OLARTE (J.) and GALINDO (E.)
Salmonella typhi resistant to chloramphenicol, ampicillin epidemic in Mexico.
Antimicrob. Agents Chemother., 1973, **4,** (597-601).

191 - O.M.S.
Les vaccins buccaux contre les entérobactéries.
Série de rapports techniques, n° 500, Genève, 1972.

192 - O.M.S.
Surveillance des **Salmonella,** autres que **S. typhi** et **S. paratyphi,** 1973.
Relevé Epidém. Hebd., 1975, **52,** (437-443).

193 - O.M.S.
Surveillance des **Salmonella.**
Relevé Epidém. Hebd., 1976, **51,** (1-8).

194 - ORNSTEIN (L.)
Annals N.Y. Acad. Sci., 1964, **121,** (321).

195 - PAPA (F.)
A propos d'une épidémie à **Salmonella wien.**
Méd. Mal. Infect., 1971, **1,** (103-108).

196 - PAPA (F.) et SARI (L.)
Formes septicémiques au cours d'épidémies à **Salmonella wien** et **Salmonella typhimurium.**
Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 1970, **48,** (53-60).

197 - PEYRAMOND (D.), BERTRAND (J.L.), CAVAILLES (M.) et BERTOYE (A.)
Les salmonelloses non typhoïdiques de l'adulte. Etude clinique. Thérapeutique. Prévention.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8,** (n° 4 bis spécial), (186-192).

198 - PHARMACIA
Manuel de travail pour la chromatographie d'échange d'ions.
Pharmacia édit., 1970.

199 - PHARMACIA
Pharmacia electrophoresis calibration kits.
Manuel de travail, janvier 1979.

200 - PLANT (J.), GLYNN (A.A.) and WILSON (B.M.)
Protective effects of a supernatant factor from **Salmonella typhimurium** on **Salmonella typhimurium** infection of inbred mice.
Infect. Immun., 1978, **22,** (125-131).

201 - POHL (P.), THOMAS (J.), LAUB (R.), GHYSELS (G.) et VAN OYE (E.)
Evolution en Belgique de la résistance aux antibiotiques chez **Salmonella typhimurium.**
Méd. Mal. Infect., 1974, **4,** (57-63).

202 - PORATH (J.), FLODIN (P.)
Nature, 1959, **183,** (1657).

203 - QUENTIN (C.) et GUTMANN (L.)
L'antibiothérapie des infections à salmonelles.
Rev. Prat., 1978, **28,** (n° 48), (3749-3751).

204 - RADOLA (B.J.)
Thin-layer isoelectric focusing of proteins.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, **194,** (335).

205 - RADOLA (B.J.)
Analytical and preparative isoelectric focusing of proteins in Sephadex and Bio-Gel layers. Protides.
Biol. Fluids Proc. Colloq., 1971, **18,** (487-491).

206 - RADOLA (B.J.)
Isoelectric focusing in layers of granulated gels. I. - Thin-layer isoelectric focusing.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, **295,** (412).

207 - RADOLA (B.J.)
Analytical and preparative isoelectric focusing in Gel-stabilized layers.
Ann. New York Acad. Sciences, 1973, **209,** (127).

208 - RADOLA (B.J.)
Isoelectric focusing in layers of granulated gels. 2. - Preparative isoelectric focusing.
Biochim. Biophys. Acta, 1974, **386,** (181-195).

209 - RAETTIG (H.)
L'immunisation «locale» au moyen de microorganismes inactivés cent ans après la naissance de Besredka.
Bull. Inst. Pasteur, 1971, **69,** (91-97).

210 - RAETTIG (H.)
Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen. Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert Koch - Institut.
Bundesgesundheitsblatt 14, 1971, **11,** (141-147).

211 - RAETTIG (H.)
Combined vaccines from inactivated enterobacteriaceae for oral application.
Progr. Immunobiol. Stand., 1971, **15,** (49-55).

212 - RAFFEL (S.)
Immunity, hypersensitivity and serology.
Appleton-Century-Crofts. New York, 1953, (419).

213 - RAFFI (A.), VERON (M.), KAZMIERCZAK (A.), COLIN (P.) et SCHIRRER (J.)
124 cas d'infections du nourrisson à **Salmonella panama.**
Pédiatrie, 1970, **7,** (721-733).

214 - RAISTICK (H.), TOPLEY (W.W.C.)
Immunizing fractions isolated from **Bact. aertryke.**
Brit. J. Exp. Pathol., 1934, **15,** (113-130).

215 - REILAND (J.)
Methods in Enzymology, Acad. Press., New York, 1971, **22,** (287).

216 - RENDU (R.)
Comment a pu naître la croyance en l'efficacité de la vaccination antitypho-paratyphoïdique.
Lyon Méd., 1954, **86,** (n° 38), (243).

217 - RENDU (R.)
Les premiers essais de vaccination contre la fièvre typhoïde (1911-1913).
Progr. Méd., 1954, **82,** (n° 24), (520).

218 - RENDU (R.)
A propos de la vaccination antitypho-paratyphique. Résultats d'autrefois et d'aujourd'hui.
Lyon Méd., 1955, **87,** (n° 4), (86).

219 - ROBERT (D.)
Etude du macrophage alvéolaire dans la protection contre les infections respiratoires par les ribosomes bactériens.
Thèse de doctorat de spécialité (Biochimie), Lyon 1977, n° 623.

220 - ROBERTSON (R.P.), WAMAB (F.A.) and RAASCH (F.O.)
Evaluation of chloramphenicol and ampicillin in **Salmonella** enteric fever.
New Engl. J. Med., 1968, **278,** (171-176).

221 - ROBYT (J.F.), REMIS (S.)
Use of the Auto Analyzer Technicon.
Analytical Biochemistry, 1967, **19,** (56-60).

222 - ROSENSTEIN (B.J.)
Salmonellosis in infants and children : epidemiologic and therapeutic considerations.
J. Pediat., 1967, **70,** (1-7).

223 - RYDER (R.W.), MERSON (M.H.), POLLARD (R.A.) and GANGAROSA (E.J.)
From the center for disease control : salmonellosis in the United States 1968-1974.
J. Infect. Dis., 1976, **133,** (483).

224 - SANDERS (W.L.)
Treatment of typhoid fever : a comparative trial of ampicillin and chloramphenicol.
Brit. Med. J., 1965, **2,** (1226-1227).

225 - SAPHRA (J.) and WINTER (J.W.)
Clinical manifestations of salmonellosis in man. An evaluation of 779 human infections identified at the New York **Salmonella** center.
New Engl. J. Med., 1957, **256,** (1128-1139).

226 - SARRAT (H.), LE MINOR (L.), LE MINOR (S.), LAFAIX (C.) et MAYDAT (L.)
Etude d'une épidémie à **Salmonella ordonez** dans la région de Dakar.
Path. Biol., 1972, **20,** (577-582).

227 - SCHOUTENS (E.), STERNON (E.)
Salmonelloses et néoplasie. A propos de 23 cas.
Pathologie et Biologie, 1969, **17,** (473-478).

228 - SEPETJIAN (M.), CHASSIGNOL (S.), GILLET (P.) et THOMAS (A.)
Enquête d'un service d'hygiène hospitalière sur une épidémie à **Salmonella wien** dans un hôpital d'enfants.
Pédiatrie, 1973, **28,** (847).

229 - SERGEEV (W.W.), ELKINA (S.I.), SHUSTER (B.J.U.), LIMAREV (W.Q.)
Sm-d **Shigella** und **Salmonella**-Mutanten zur Grundlaye der Gewinnung enterales Lebendvakzine.
Z. ges. Hyg. Grenzgeb., 1973, **19,** (657).

230 - SERGEEV (W.W.), FROLOVA (M.A.), PROTASOVA (D.V.), ELKINA (S.I.), SHUSTER (B.J.U.)
Sur le mécanisme de l'immunogénèse dans la vaccination avec les mutants Sd de **Salmonella** et **Shigella.** II. - La non réceptivité des souris à **S. enteritidis,** dans l'immunisation avec le mutant et la culture tuée (en russe).
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1970, **47,** (n° 5), (127).

231 - SEVERTSOVA (M.K.), STANISIAVSKY (E.S.)
Immunity to experimental salmonellosis infection and the molecular weight heterogenicity of **S. typhimurium** antigenic complexes.
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1977, **54,** (79-85).

232 - SMITH (H.W.)
The use of live vaccines in experimental **Salmonella gallinarum** infection in chicken with observations on their interference effect.
J. Hyg., 1956, **54,** (419).

233 - SMITH (H.W.)
The immunization of mice, calves and pigs against **Salmonella dublin** and **Salmonella choleraesuis** infections.
J. Hyg., 1965, **63,** (117).

234 - SMITH (R.A.) and BIGLEY (N.J.)
Ribonucleic acid-protein fractions of virulent **Salmonella typhimurium** as protective immunogens.
Infect. Immun., 1972, **6,** (377-383).

235 - SMITH (R.A.), BIGLEY (N.J.)
Detection of delayed hypersensitivity in mice infected with ribonucleic acid-protein fractions of **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1972, **6,** (384-389).

236 - SPACKMAN (D.H.), STEIN (W.H.), MOORE (S.)
Automatic recording apparatus for use in the chromotography of amino-acids.
Anal. Chem., 1958, **30,** (1190-1206).

237 - STASILEVITCH (Z.K.), SERGEEV (W.W.), VOSKANYAN (N.A.), GORISLAVETS (I.I.), LIMAREV (V.A.), ELKINA (S.I.), SHUSTER (B.J.U.)
Essai sur des singes de vaccins à base de **Salmonella** vivantes, streptomycino-dépendantes (en russe).
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1972, **49,** (n° 4), (120).

238 - STERNE (M.) and TRIM (G.)
Assay of typhoid vaccines in mice.
J. Med. Microbiol., 1974, **7,** (197).

239 - SUERI (L.), CIAMMARUCHI (R.) et CADEO (G.P.)
Aspetti clinici delle Salmonelloni.
Giorn. Mal. Inf. Paras., 1976, **28,** (347-353).

240 - SWINGLE (S.M.), TISELIUS (A.)
Biochem. J., 1951, **48,** (171).

241 - TANAKA (T.), IKEMURA (K.), TSUNODA (M.), SASAGANA (I.) and MITSUMASHI (S.)
Drug resistance and distribution of R factors in **Salmonella** strains.
Agents Antimicrob. Chemother., 1976, **9,** (65-69).

242 - TISELIUS (A.)
Ark. Kemi., 1954, **7,** (445).

243 - TKACHENKO (V.N.)
Etudes expérimentales sur les propriétés immunogènes de mutants de **Salmonella typhimurium** ayant besoin de guanine (en russe).
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1967, **44,** (n° 10), (102).

244 - TOPLEY (W.W.C.), GREENWOOD (M.) and WILSON (J.)
A strain of **Bact. aertriche** with unusual epidemic characters.
J. Path. Bact., 1931, **34,** (523).

245 - TULLY (J.G.), GAINES (S.)
H antigen of **Salmonella typhosa.**
J. Bacteriol., 1961, **81,** (924).

246 - TULLY (J.G.), GAINES (S.), TIGERTT (W.D.)
Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV - Role of H antigen in protection.
J. Infect. Dis., 1963, **112,** (118).

247 - TULLY (J.G.), GAINES (S.), TIGERTT (W.D.)
Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VI. - Response of chimpanzees to endotoxin and the effect of tolerance on resistance to oral challenge.
J. Infect. Dis., 1965, **115,** (445-455).

248 - URIEL (J.), BERGES (J.), BOSCHETTI (E.) et TIXIER (R.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1971, **273,** (2358).

249 - VAN OYE (E.) et VASSILIADIS (P.)
Ostéomyélites à salmonelles et hémoglobinopathies in : «The world problems of salmonellosis».
Edited by E. VAN OYE.

250 - VARTIAINEN (J.) and HURRI (C.)
Arthritis due to **Salmonella typhimurium.** Report of 12 cases of migratory arthritis in association with **Salmonella typhimurium.**
Acta Med. Scand., 1964, **175,** (771-776).

251 - VENNEMAN (M.R.)
Purification of immunogenically active ribonucleic acid preparations of **Salmonella typhimurium** : molecular-sieve and anion- exchange chromatography.
Infect. Immun., 1972, **5,** (269-282).

252 - VENNEMAN (M.R.) and BERRY (L.J.)
Serum mediated resistance induced with immunogenic preparations of **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1971, **4,** (374-380).

253 - VENNEMAN (M.R.), BERRY (L.J.)
Cell-mediated resistance induced with immunogenic preparations of **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1971, **4,** (381-387).

254 - VENNEMAN (M.R.) and BERRY (L.J.)
Experimental salmonellosis. Differential passive transfer of immunity with serum and cells obtained from ribosomal and ribonucleic acid immunized mice.
J. Reticuloendoth. Soc., 1971, **9,** (491-502).

255 - VENNEMAN (M.R.) and BIGLEY (N.J.)
Isolation and partial characterization of an immunogenic moiety obtained from **Salmonella typhimurium.**
J. Bacteriol., 1969, **100,** (140-148).

256 - VENNEMAN (M.R.), BIGLEY (N.J.) and BERRY (L.J.)
Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from **Salmonella typhimurium.**
Infect. Immun., 1970, **1,** (574-582).

257 - VERLIAC (F.)
Les salmonelloses de l'enfant.
Concours Méd., 1978, **100,** (76-80).

258 - VILDE (J.L.), LAGRANGE (P.), KOSKAS (E.) et BASTIN (R.)
Physiopathologie des infections à salmonelles.
Méd. Mal. Infect., 1978, **6,** (295-302).

259 - VLADOIANU (I.R.), DUBINI (F.)
Experimental model of oral antityphoid vaccination with live streptomycin-dependant **Salmonella typhimurium** in C 57-BL/6 mice.
J. Hyg., 1975, **75,** (215).

260 - VLADOIANU (I.R.), DUBINI (F.), BOLLOLI (A.)
Contribution to the study of live streptomycin-dependant **Salmonella** vaccines : the problem of reversion to a virulent form.
J. Hyg., 1975, **75,** (203).

261 - WAHDAN (M.H.), SIPPEL (J.E.), MIKHAIL (I.A.), RAHKA (A.E.), ANDERSON (E.S.), SPARKS (H.A.) and CVJETANOVIC (B.)
Controlled field trial of a typhoid vaccine prepared with a nonmotile mutant of **Salmonella typhi** Ty 2.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1975, **52,** (69).

262 - WALDMAN (R.H.), GRUNSPAN (R.), GANGULY (R.)
Oral immunization of mice with killed **Salmonella typhimurium** vaccine.
Infect. Immun., 1972, **6,** (58-61).

263 - WALDVOGEL (F.A.) and PITTON (J.S.)
Typhoid fever imported from Mexico to Switzerland. Studies on R factor mediated chloramphenicol resistance.
J. Hyg., 1973, **71,** (509-513).

264 - WEBER (K.), PRINGLE (J.R.), OSBORN (M.).
Methods in Enzymology, 1972, **26,** (1).

265 - WEBSTER (L.T.)
Experiments on normal and immune mice with a bacillus of mouse typhoid.
J. Exper. Med., 1922, **36,** (71).

266 - WINTER (A.), PERLMUTTER (H.), DAVIES (H.)
Preparative flat-bed electrofocusing in a granulated gel with the LKB 2117 Multiphor.
LKB - Application Note 198, 1975.

267 - WOLFE (M.S.), ARMSTRONG (D.), LOURIA (D.B.), BLEVINS (A.)
Salmonellosis in patients with neoplastic disease.
Arch. intern. Méd., 1971, **128,** (546-554).

268 - YOUMANS (A.S.) and YOUMANS (G.P.)
Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from **Mycobacterium tuberculosis.**
J. Bacteriol., 1965, **89,** (1291-1298).

269 - YUGOSLAV TYPHOID COMMISSION
Field and laboratory studies with typhoid vaccines. A preliminary report.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1957, **16,** (897).

270 - YUGOSLAV TYPHOID COMMISSION (B.CVJETANOVIC)
A controled field trial on the effectiveness of phenol and alcohol typhoid vaccines.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1962, **86,** (357-369).